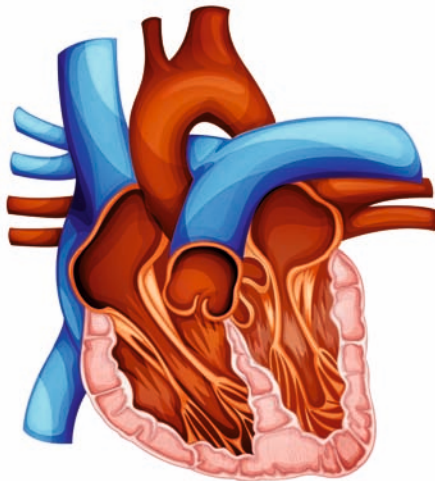


Mechanismen der Toll-like Rezeptor 2-vermittelten Myokardschädigung nach Ischämie und Reperfusion in der Maus

Kathrina Latsch



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem „Institut für Veterinär - Physiologie und - Biochemie der
Justus - Liebig - Universität Gießen“

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Joachim Roth

und

der „Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie der
Goethe - Universität Frankfurt am Main“

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Kai Zacharowski, FRCA

Mechanismen der Toll-like Rezeptor 2-vermittelten Myokardschädigung nach Ischämie und Reperfusion in der Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Kathrina Latsch

Tierärztin aus Würzburg

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Joachim Roth
Prof. Dr. Dr. Kai Zacharowski, FRCA

Tag der Disputation: 5. Juli 2012

Meinen Eltern

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	IV
------------------------------------	-----------

Abkürzungsverzeichnis	VIII
------------------------------------	-------------

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Myokardischämie und Reperfusionssyndrom	1
1.2.	Toll-like Rezeptoren und angeborene Immunabwehr	3
1.2.1.	TLR - Signaltransduktion.....	7
1.2.2.	Toll-like Rezeptor 2.....	11
1.2.3.	Die Rolle von TLR2 während Myokardischämie/Reperfusion (MI/R)	14
1.3.	Biglykan	16
1.3.1.	Struktur und Funktion	16
1.3.2.	Biglykan und Myokardinfarkt	18
1.3.3.	Biglykan und TLR	18
1.4.	Fragestellung.....	19
2.	Material und Methoden.....	21
2.1.	Material.....	21
2.1.1.	Zellkultur	21
2.1.2.	OP/Organentnahme-Material	22
2.1.3.	Chemikalien.....	23
2.1.4.	Sonstiges Verbrauchsmaterial.....	24
2.1.5.	Geräte.....	25
2.1.6.	Software	28
2.2.	Puffer und Lösungen	29
2.3.	Methoden	31
2.3.1.	<i>In-vivo</i> Methoden	31
2.3.2.	Zellbiologische Methoden.....	39
2.3.3.	Proteinbiochemische Analysen	43
2.3.4.	Auswertung der Western Blots	47
2.3.5.	Präparation und Isolation von RNA aus Zellen.....	47

2.3.6.	Statistische Analyse.....	52
3.	Ergebnisse	53
3.1.	Untersuchung des PI3K/Akt-Signalwegs bei MI/R	53
3.1.1.	Auswirkungen der Inhibition von Akt oder PI3K auf die Kardioprotektion bei TLR2-Defizienz.....	53
3.1.2.	Basale Akt1-Proteinexpression in TLR2 ^{-/-} - und WT- Herzen.....	54
3.1.3.	Akt1-Proteinexpression in WT- und TLR2 ^{-/-} -Herzen nach MI/R	55
3.2.	Untersuchung der Rolle von Biglykan als TLR2-Ligand <i>in vitro</i>	61
3.2.1.	Aktivierung von TLR2 durch Biglykan in HEK Blue™ Zellen.....	61
3.2.2.	Aktivierung von TLR2 oder TLR4 durch Biglykan in THP1X Blue™ Zellen.....	63
3.2.3.	Aktivierung von TLR2 oder TLR4 durch Biglykan-Stimulation in RAW264.7 Makrophagen.....	64
3.3.	Untersuchung der Rolle von Biglykan bei MI/R <i>in vivo</i>	66
3.4.	Untersuchung der Auswirkungen der Biglykan-Defizienz auf die TLR2-Proteinexpression.....	67
3.5.	Untersuchung der Auswirkungen der Biglykan-Defizienz auf die Akt1-Proteinexpression.....	69
3.6.	Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit Mausplasma	71
3.6.1.	Auswirkungen der Stimulation mit Mausplasma auf die SEAP-Sekretion in HEK Blue™ hTLR2 und –mTLR2 Zellen	71
3.6.2.	Aktivierung von NFκB nach Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit Mausplasma	74
3.6.3.	Zytokinantwort nach Stimulation mit Mausplasma.....	81
3.6.4.	Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Mausplasma	85
3.6.5.	Stimulation von THP1X Blue™ Zellen mit Mausplasma	87
3.7.	Stimulation von RAW264.7 Makrophagen mit Mausplasma	88
4.	Diskussion.....	93
5.	Schlussfolgerung und Ausblick	104
6.	Zusammenfassung	106

7.	Summary	108
8.	Literaturverzeichnis	110
9.	Publikationen	117
10.	Projektförderung	118
11.	Danksagung	118
12.	Erklärung	119

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Struktur des Toll-like Rezeptors.....	5
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion nach TLR-Stimulation.....	10
Abbildung 1.3: Pam ₃ Cys-SK4	11
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des PI3K/Akt-Signalwegs nach TLR2-Aktivierung..	13
Abbildung 1.5: Biglykan	17
Abbildung 2.1: Maus in modifizierter Seitenlage.....	33
Abbildung 2.2: Linkes Bild: Umstechen des <i>Ramus interventricularis anterior</i> (RIVA). Rechtes Bild: Ligatur des RIVA mittels Microserrefine-Klemme.....	34
Abbildung 2.3: Nach 30-minütiger Ischämie wird die Ligatur gelöst und der Faden im Myokard belassen.....	35
Abbildung 2.4: Herz nach Perfusion mit Evans Blue und nach Färbung mit NBT	37
Abbildung 3.1: Effekt der Inhibition von PI3K bzw. Akt1 auf die myokardiale Schädigung nach MI/R	54
Abbildung 3.2: Protein- und mRNA-Expression von Akt1 in Herzen von <i>knockout</i> (TLR2 ^{-/-}) und Wildtyp (WT)-Mäusen	55
Abbildung 3.3: Relative Akt1-Proteinexpression und relativer Proteingehalt von phosphoryliertem Akt1 (pAkt1) im Wildtyp (WT)- und TLR2-defizienten (TLR2 ^{-/-})-Myokard nach MI/R	56
Abbildung 3.4: Proteinexpression von PI3K und phosphoryliertem PI3K (pPI3K) in Wildtyp (WT)- und TLR2- <i>knockout</i> (TLR2 ^{-/-})-Myokard nach MI/R.....	57
Abbildung 3.5: Akt1-Proteinexpression nach 30min Ischämie und 24h Reperfusion	58
Abbildung 3.6: Korrelation der relativen Proteinexpression von Akt1 und dem relativen Proteingehalt an phosphoryliertem Akt1 (pAkt1) mit der Infarktgröße/ <i>area at risk</i> (IS/(%AR)).....	59
Abbildung 3.7: Korrelation der relativen Proteinexpression von Akt1 und dem relativen Proteingehalt an phosphoryliertem Akt1 (pAkt1) mit der Infarktgröße/ <i>area at risk</i> (IS/(%AR)).....	60
Abbildung 3.8: SEAP-Expression in HEK Blue™ hTLR2- und HEK Blue™ mTLR2 Zellen Stimulation mit Pam ₃ Cys und Biglykan	62
Abbildung 3.9: SEAP-Expression in THP1X Blue™ Zellen nach Stimulation mit Pam ₃ Cys und Biglykan.....	63

Abbildung 3.10: Zytokinantwort nach Stimulation von RAW264.7 Makrophagen mit Pam ₃ Cys und Biglykan	65
Abbildung 3.11: Infarktgröße und Troponin T in Wildtyp (WT)- und Biglykan- <i>knockout</i> (Bgn ^{-/-})-Mäusen nach 24h Reperfusion.....	66
Abbildung 3.12: Relative Proteinexpression von TLR2 im <i>knockout</i> (Bgn ^{-/-})- und Wildtyp (WT)-Myokard.....	67
Abbildung 3.13: TLR2-Proteinexpression im Myokard nach 30min Ischämie und 2h oder 24h Reperfusion von Wildtyp (WT) und <i>knockout</i> (Bgn ^{-/-})	68
Abbildung 3.14: Vergleich der relativen Proteinexpression von Akt1 und phosphorylierten Akt1 (pAkt1) im Wildtyp (WT)- und Biglykan- <i>knockout</i> (Bgn ^{-/-})-Myokard nach 30min Ischämie und 24h Reperfusion	70
Abbildung 3.15: NFκB-vermittelte SEAP-Sekretion nach Pam ₃ Cys-Stimulation im Zeitverlauf.....	72
Abbildung 3.16: SEAP-Sekretion nach Plasmastimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen	73
Abbildung 3.17: SEAP-Sekretion nach Plasmastimulation von HEK Blue™ mTLR2 Zellen	74
Abbildung 3.18: Western Blot-Analyse von IκBα und IκBα-Phosphorylierung in HEK Blue™ hTLR2 Zellen nach Stimulation mit Pam ₃ Cys	75
Abbildung 3.19: Western Blot-Analyse von IκBα und IκBα-Phosphorylierung in HEK Blue™ Null Zellen nach Stimulation mit Pam ₃ Cys	77
Abbildung 3.20: Proteinexpression von IκBα und Proteingehalt von phosphorylierten IκBα (pIκBα) in HEK Blue™ hTLR2 Zellen nach Stimulation mit Plasma von MI/R-operierten Mäusen	78
Abbildung 3.21: Proteinexpression von IκBα und Proteingehalt von phosphorylierten IκBα (pIκBα) in HEK Blue™ hTLR2 Zellen nach Stimulation mit Plasma von MI/R-operierten Mäusen	80
Abbildung 3.22: Relative Zytokin-mRNA-Expression nach Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit Pam ₃ Cys	82
Abbildung 3.23: Zytokin-mRNA-Expression nach Stimulation von HEK Blue™ Null Zellen mit Pam ₃ Cys	83
Abbildung 3.24: Zytokinantwort nach Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit Mausplasma nach MI/R.....	84
Abbildung 3.25: Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Plasma oder FCS	86

Abbildung 3.26: SEAP-Sekretion nach Stimulation von THP1X Blue™ Zellen mit Plasma von Mäusen nach MI/R	88
Abbildung 3.27: Western Blot für IκBα und phosphoryliertes IκBα (pIκBα) nach Stimulation von RAW264.7 Makrophagen mit Pam ₃ Cys	90
Abbildung 3.28: Western Blot für IκBα und phosphoryliertes IκBα (pIκBα) nach Stimulation von RAW264.7 Makrophagen mit Mausplasma.....	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Exogene und endogene TLR-Liganden	6
Tabelle 2: Zellzahl pro Well auf 6 <i>well</i> -Zellkulturplatte	42
Tabelle 3: Standardreihe für Proteinbestimmung nach Bradford	44
Tabelle 4: Primärantikörper Western Blot	46
Tabelle 5: Sekundärantikörper Western Blot.....	47
Tabelle 6: Primer	51

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	<i>activating-protein-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ANR	Area not at Risk
AR	Area at Risk
BAD	<i>Bcl-2 associated death promotor potein</i>
Bgn	Biglykan
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	zur RNA komplementäre DNA
CpG-DNA	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-DNA
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
DAMP	<i>danger associated molecular patterns</i>
DEPC	Diethylpyrokarbonat
dest. H ₂ O	destilliertes H ₂ O
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ERK1,2	<i>extracellular-signal-regulated kinase 1,2</i>
et al.	und andere
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase
GAG	Glukosaminoglykan
h	Stunde
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin 1 Rezeptor
IκB	Inhibitor von κB

IKK	I κ B Kinase
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
IRAK	IL-1R-assoziierte Kinase
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
LRRs	<i>leucin rich repeats</i>
MALP	Makrophagen-aktivierendes Lipoprotein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
mg	Milligramm
min	Minute
MI/R	Myokardischämie/Reperfusion
MKK	mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinasen
mRNA	„Boten“-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
MyD88	myeloider Differenzierungsfaktor 88 (<i>myeloid differentiation factor 88</i>)
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblautetrazolium
NF κ B	Nuklearfaktor κ B
OD	optische Dichte
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK	Phosphoinositid-abhängige Kinase
PH	Pleckstrin-Homologie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIPA	Radioimmunopräzipitations-Assay
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)

ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RT-qPCR	quantitative <i>realtime</i> -PCR
SARM	<i>sterile α- und armadillo-motif-containing protein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEAP	<i>secreted alkaline phosphatase</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SH2	2-Src Homologdomänen
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLRP	<i>small-leucine-rich proteoglycan</i>
TAB	TAK1-bindendes-Protein
TAK	<i>transforming-growth-factor-β-aktivierten Kinase</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamine
TGF	<i>transforming-growth-factor</i>
TIR	Toll/IL-1R
TIRAP	<i>MyD88-adaptor-like</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRAF	Tumornekrosefaktor Rezeptor-assoziiierter Faktor
TRAM	<i>TRIF-related-adaptor-molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing-adaptor Protein inducing interferon β</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
μ g	Mikrogramm

1. Einleitung

1.1. Myokardischämie und Reperfusionssyndrom

Im Jahr 2010 verstarben in Deutschland 352.689 Menschen an den Folgen von Herz-/Kreislaufkrankungen, damit waren diese mit 41,1% aller Sterbefälle die häufigste Todesursache. Zu den Herz-/Kreislaufkrankungen zählt unter anderem der akute oder rezidivierende Myokardinfarkt, an dem im Jahr 2010 59.107 Menschen verstarben. Damit war der Myokardinfarkt die häufigste Einzeltodesursache (Pressemitteilung Nr. 354 des Statistischen Bundesamtes vom 23.09.2011).

Entsprechend der Diagnose im EKG lassen sich Patienten mit Myokardinfarkt in zwei verschiedene Gruppen einteilen. Zum einen sind dies Patienten, bei denen im EKG ein Befund mit Hebung der ST-Strecke und zum anderen Patienten, bei denen keine ST-Streckenhebung nachzuweisen ist. Anhand dieser Einteilung werden verschiedene therapeutische Maßnahmen eingeleitet. Im Folgenden soll sich auf den Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung beschränkt werden [1, 2].

Die häufigste Ursache für einen Verschluss der Koronararterien sind Thromben, welche nach der Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques gebildet werden [3]. Diese Plaques entstehen im Verlauf der Degeneration der Gefäßwand bei Artherosklerose. Sie bestehen unter anderem aus Bindegewebe, kristallinem Cholesterol, Makrophagen, T-Lymphozyten und thrombotischen Material [4]. Nach dem thrombotischen Verschluss kommt es in dem durch die Koronararterie versorgten Gebiet zur Ischämie des Gewebes. Dort kann infolge des Sauerstoffmangels keine Energie mehr über die oxidative Phosphorylierung hergestellt werden, so dass der Energiestoffwechsel zugunsten der anaeroben Glykolyse verschoben wird. Gleichzeitig kommt es zu einer Ansammlung von metabolischen Abbauprodukten, die durch den verminderten Blutfluss nicht mehr abtransportiert werden können [5].

Die Dauer der Ischämie beeinflusst maßgeblich das Ausmaß der Gewebenekrose, die sich im Verlauf der Ischämie von subendokardial nach subepikardial ausbreitet („*wavefront phenomenon*“) [6]. Somit gilt die möglichst zeitnahe Reperfusion des ischämischen Gewebes als die Therapie der Wahl. Als optimale Therapie gilt dabei die perkutane Koronarintervention, bei der das verschlossene Gefäß z.B. mittels Ballonkatheter

rekanalisiert wird [3]. Dabei zeigt sich allerdings, dass es durch die Reperfusion zu einer weiteren Schädigung des betroffenen Gewebes kommt [7].

Braunwald und Kloner beschreiben die Reperfusion des Myokards als „zweischneidiges Schwert“, da diese von einer beschleunigten Nekrose der Kardiomyozyten und kontraktile Dysfunktion des Myokards („*myocardial stunning*“) begleitet wird [8].

Die zusätzliche Schädigung des Myokards durch die Reperfusion wird als „Reperfusionssyndrom“ bezeichnet. Dieses beinhaltet neben der oben genannten myokardialen Dysfunktion und der Nekrose der Kardiomyozyten außerdem das Auftreten von Arrhythmien sowie das „*no-Reflow*“ Phänomen. Letzteres ist durch endotheliale Dysfunktion infolge gestörter Vasodilatation und gleichzeitig vermehrte Produktion von Vasokonstriktoren wie z.B. Endothelin I gekennzeichnet. Weiterhin führen Plättchenaggregate und neutrophile Granulozyten zu einer mikrovaskulären Obstruktion. Die Kombination beider Phänomene im betroffenen Gebiet führt zu einer persistierenden Minderdurchblutung im eigentlich reperfundierten Gewebe [9, 10].

Es werden verschiedene pathophysiologische Mechanismen wie zum Beispiel die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Inflammation mit Aktivierung von neutrophilen Granulozyten sowie verschiedene metabolische Störungen wie der sogenannte „*Calcium-Overload*“ der Herzmuskelzelle als Ursache für das „Reperfusionssyndrom“ diskutiert [10, 11].

Sobald das ischämische Gebiet wieder reperfundiert wird, entstehen aus molekularem Sauerstoff Superoxidanionen und Hydroxylradikale, welche die Lipidmembran der Zellen irreversibel schädigen können und durch eine verstärkte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin (GMP-140) die Infiltration von neutrophilen Granulozyten vermitteln [12-14]. Neben ROS kommt es auch durch Faktoren wie Komplementfaktor C5a und Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin-1 (IL 1), Interleukin-6 (IL 6) und Interleukin-8 (IL 8) zu einer Aktivierung von neutrophilen Granulozyten [15]. So zeigten McManus et al. immunhistologisch eine weite Verbreitung der Komplementfaktoren C3, C4 und C5 im Infarktgebiet 24 Stunden nach Ligatur der linken Koronararterie [16]. Nach der Aktivierung setzen neutrophile Granulozyten wiederum ROS und Enzyme wie Proteasen und Collagenasen frei, welche das Gewebe weiter schädigen [17].

Durch den Energiemangel während der Ischämie kommt es außerdem zu einer Ansammlung von Kalziumionen im Zytosol der Kardiomyozyten. Werden die Zellen im Verlauf der Reperfusion wieder mit Energie versorgt, liegt initial noch ein sehr hoher Kalziumspiegel im Zytosol vor, welcher zu einer exzessiven Aktivierung der Myofibrillen und schließlich zu einer Hyperkontraktion der Herzmuskelzellen führt. Diese Hyperkontraktionen können zu einer irreversiblen Schädigung des Zytoskeletts führen [18].

Im Tiermodell ist es bereits vielfach gelungen das Reperfusionssyndrom zu modulieren und den Schaden einzugrenzen. Leider konnte bisher kaum einer dieser Ansätze erfolgreich in den klinischen Alltag übernommen werden, um eine Verbesserung für den Patienten zu erreichen [11, 19].

1.2. Toll-like Rezeptoren und angeborene Immunabwehr

Die angeborene Immunabwehr umfasst verschiedene Mechanismen, welche zwischen körpereigenen und körperfremd unterscheiden können. Sie ist damit neben anatomischen und physiologischen Barrieren wie Haut und Schleimhaut, mukoziliären Clearance-Mechanismen, sowie den Enzymen der Speichel- und Tränenflüssigkeit die erste Möglichkeit des Körpers auf eingedrungene Mikroorganismen zu reagieren [20, 21]. Des Weiteren ist es die Aufgabe der angeborenen Immunabwehr, zu der Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und das Komplementsystem gehören, die adaptive oder erworbene Immunabwehr zu aktivieren, die durch T- und B-Lymphozyten vermittelt wird [20].

Während die adaptive Immunabwehr spezifische Rezeptoren verwendet, die während der Ontogenese individuell gebildet werden, nutzt die angeborene Immunabwehr Rezeptoren, die phylogenetisch konserviert und bereits im Genom codiert sind. Diese Rezeptoren werden als *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) bezeichnet, die spezifische pathogen assoziierte Strukturen (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen.

PAMPs sind molekulare Strukturen, welche essentiell für das Überleben von Mikroorganismen sind. Sie werden von großen Gruppen von Mikroorganismen geteilt und weisen keine Gemeinsamkeiten mit Strukturen im Wirtsorganismus auf. So sind sie klar von körpereigenen Strukturen abgrenzbar, wodurch eine mögliche Schädigung dieser durch das Immunsystem verhindert wird. Diese Strukturen unterliegen keiner Variabilität infolge von Mutationen, da solche in der Regel letale Auswirkungen auf den Mikroorganismus haben.

Die genannten Eigenschaften erlauben den PRRs trotz der limitierten Anzahl genetisch codierter Rezeptoren eine große Anzahl pathogen-assoziiierter Strukturen zu erkennen [22]. Zu den PRRs gehören die Toll-like Rezeptoren (TLR). Die Entdeckung der TLRs begann 1985 mit der Identifikation von „Toll“ in *Drosophila melanogaster*, welches dort für die Ausbildung der dorso-ventralen Achse während der Embryonalentwicklung verantwortlich ist [23]. Eine nachfolgende Studie ergab, dass „Toll“ bei *Drosophila* außerdem eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pilzinfektionen zukommt [24]. 1997 wurde das erste humane Homolog zum *Drosophila* „Toll“ durch Charles A. Janeway jr. beschrieben [25]. Bis heute sind in der Maus 12 (TLR1-9 und TLR11-13) und im Menschen 10 (TLR1-TLR10) verschiedene TLRs identifiziert worden [26]. Die humanen TLRs lassen sich aufgrund der Aminosäuresequenzen in 5 Subfamilien unterteilen. Diese sind die TLR2-Subfamilie, bestehend aus TLR1, TLR2, TLR6 und TLR10, die TLR9-Subfamilie, die aus TLR7, TLR8 und TLR9 besteht, sowie die TLR3-, die TLR4- und die TLR5-Subfamilie [27]. Jeder TLR erkennt spezifische Strukturen von Viren, Bakterien, Mykobakterien, Pilzen und Parasiten (siehe Tabelle 1) [28].

Die TLRs sind transmembrane Glykoproteine vom Typ I, deren extrazelluläre Domäne sogenannte „*leucine rich repeats*“ (LRRs) enthält. Die zytoplasmatische Region wird aufgrund der Homologie zu der zytoplasmatischen Region des Interleukin 1 Rezeptors (IL-1R) als Toll/IL-1R- oder kurz TIR-Domäne bezeichnet. Die LRR-Domäne besteht aus 19-25 Wiederholungen mit jeweils 24-29 Aminosäuren und bildet eine hufeisenförmige Struktur, bei der der Ligand an der konkaven Fläche bindet (Abbildung 1.1) [26, 29, 30].

Nach der Erkennung eines Liganden bilden die TLRs entweder Homo- oder Heterodimere aus. So ist es bekannt das TLR4 nur Homodimere, TLR2 jedoch je nach Bindung eines Liganden Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 ausbildet [31].

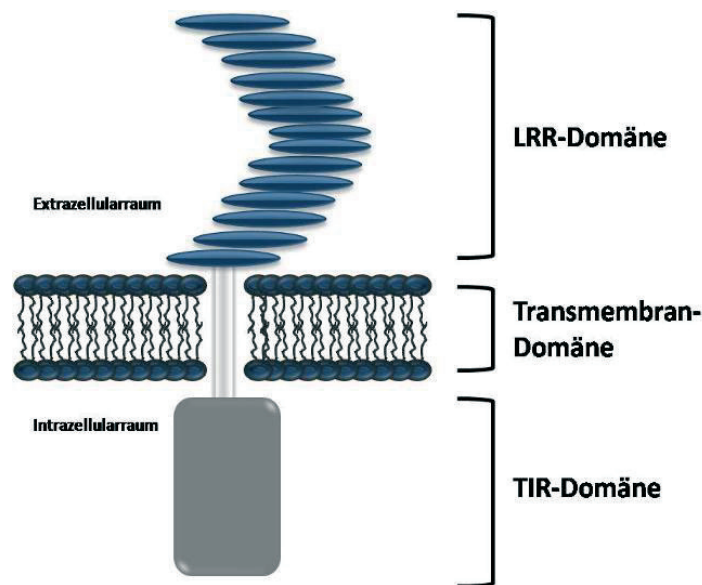


Abbildung 1.1: Struktur des Toll-like Rezeptors

Alle TLRs sind nach dem gleichen Grundprinzip aufgebaut. Die extrazelluläre Domäne dient der Erkennung von Liganden und wird durch 19-25 *leucine rich repeats* (LRR) charakterisiert. Sie ist über die Transmembrandomäne mit der intrazellulär lokalisierten Toll/IL-1R (TIR)-Domäne verbunden, über welche die Signaltransduktion nach Aktivierung erfolgt.

Die verschiedenen TLRs haben unterschiedliche Lokalisationen in der Zelle. Während TLR1, 2, 4, 5 und 6 auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, wo sie mikrobielle Zellwandkomponenten erkennen, werden TLR3, 7, 8 und 9 in intrazellulären Vesikeln exprimiert und erkennen vor allem Nukleinsäuren [32].

Neben den PAMPs erkennen TLRs auch sogenannte endogene Liganden wie die *Heat Shock* Proteine 60 und 70 oder Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Biglykan oder Heparansulfat [33-36]. Diese Moleküle werden bei Gewebe- und Zellschädigung jeglicher Art freigesetzt und als Alarmine bezeichnet. Sowohl PAMPs als auch Alarmine werden zu der Gruppe der *danger associated molecular patterns* (DAMPs) gezählt [37].

Tabelle 1: Exogene und endogene TLR-Liganden [29, 32, 38-40]

TLR	Exogene Liganden	Endogene Liganden
TLR2/1	• Triacyl-Lipopeptide (Bakterien/Mykobakterien)	
TLR2	<ul style="list-style-type: none"> • bakterielle Bestandteile <ul style="list-style-type: none"> - Peptidoglykan - Porine - Lipoarabinomannan • Bestandteile von Pilzen <ul style="list-style-type: none"> - β-Glycan - Phospholipomannan - Glucuronoxylomannan • Parasiten <ul style="list-style-type: none"> - tGPI-mutin (<i>Trypanosoma</i>) • Viren <ul style="list-style-type: none"> - Strukturprotein wie Hämagglutinin-Protein (Masern-Virus) 	<ul style="list-style-type: none"> • Hitzeschock-Protein 60 (HSP60), HSP70 • gp96 • HMGB1 • Bestandteile der Extrazellulären Matrix <ul style="list-style-type: none"> - Biglykan - Hyaluron (Degradation der extrazellulären Matrix) - Fibronectin (wird nach Schädigung von Zellen abgegeben) - Heparansulfat (wird von der Plasmamembran oder extrazellulären Matrix nach Schädigung oder bei Inflammation abgegeben) - Fibrinogen • HSPB8; αA Crystallin (synoviales Gewebe)
TLR2/6	<ul style="list-style-type: none"> • bakterielle Bestandteile <ul style="list-style-type: none"> - Lipoteichonsäure - Diacyllipopeptide • Bestandteile von Pilzen <ul style="list-style-type: none"> - Zymosan 	
TLR3	• virale Doppelstrang-RNA	• mRNA
TLR4	<ul style="list-style-type: none"> • bakterielle Bestandteile <ul style="list-style-type: none"> - Lipopolysaccharid • Bestandteile von Pilzen <ul style="list-style-type: none"> - Mannan • Parasiten <ul style="list-style-type: none"> - Glucoinositolphospholipide (<i>Trypanosoma</i>) • virale Strukturproteine 	<ul style="list-style-type: none"> • HMGB1 • Bestandteile der Extrazellulären Matrix <ul style="list-style-type: none"> - Biglykan - lösliches Hyaluron - Fibronectin (wird nach Schädigung von Zellen abgegeben) - Heparansulfat (wird von der Plasmamembran oder extrazellulären Matrix nach Schädigung oder bei Inflammation abgegeben) - Fibrinogen - Heparansulfat • Surfactantprotein-A • HSP22, -60, -70, -72
TLR5	<ul style="list-style-type: none"> • bakterielle Bestandteile <ul style="list-style-type: none"> - Flagellin 	
TLR7	• virale Einzelstrang RNA	<ul style="list-style-type: none"> • small interfering RNA (siRNA) • RNA
TLR8	• virale Einzelstrang RNA	<ul style="list-style-type: none"> • humanes kardiales Myosin • siRNA
TLR9	<ul style="list-style-type: none"> • Bakterielle Cytosin-phosphatidyl-Guanin-DNA (CpG-DNA) • fungale und virale DNA 	<ul style="list-style-type: none"> • DNA • HMGB1
TLR11	• profilin-like molecule (<i>Toxoplasma gondii</i>)	

1.2.1. TLR - Signaltransduktion

Die Signaltransduktion nach der Aktivierung von TLRs wird durch fünf Adapterproteine *myeloid differentiation factor 88* (MyD88), *MyD88-adaptor-like* (MAL bzw. TIRAP), *TIR-domain-containing-adaptor Protein inducing interferon* (IFN) β (TRIF bzw. TICAM1), *TRIF-related-adaptor-molecule* (TRAM bzw. TICAM2) sowie das *sterile α - und armadillo-motif-containing protein* (SARM) vermittelt. Diese aktivieren über Rekrutierung von Proteinkinasen schließlich Transkriptionsfaktoren wie Nuklearfaktor κ B (NF κ B) oder Mitglieder der Familie der IFN-regulierenden Faktoren (*interferon regulatory factor*, IRF) [41]. Man unterscheidet zwischen dem MyD88-abhängigen und dem MyD88-unabhängigen Signalweg.

1.2.1.1. MyD88-abhängiger Signalweg

Alle TLRs außer TLR3 binden nach Aktivierung das Adapterprotein MyD88. Bei diesen TLRs spricht man bezüglich der nachfolgenden Signaltransduktion vom MyD88-abhängigen Signalweg (Abbildung 1.2).

Nachdem MyD88 an der TIR-Domäne des TLR Rezeptors gebunden hat, wird die IL-1R-assoziierte Kinase 4 (IRAK4) an den Rezeptorkomplex rekrutiert, wo sie IRAK1 phosphoryliert. Dadurch kann der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-assoziierte Faktor 6 (TRAF6) an dem Komplex binden, welcher wiederum einen membranständigen Komplex aus der *transforming-growth-factor- β -aktivierten Kinase* (TAK) 1 und dem TAK1-bindenden-Protein (TAB) 1-3 rekrutiert. Durch diese Interaktion werden TAB2/3 und TAK1 phosphoryliert und können sich mit TRAF6 und TAB1 von der Plasmamembran ins Zytoplasma verlagern. Dies führt zur Aktivierung von TAK1, welche daraufhin wiederum den I κ B-Kinase (IKK) Komplex aktiviert.

Der IKK-Komplex besteht aus den beiden katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β sowie einer regulatorischen Untereinheit IKK γ und phosphoryliert den Inhibitor von NF κ B (I κ B), welcher bis zur Phosphorylierung NF κ B im Zytoplasma sequestriert und damit inaktiviert. NF κ B setzt sich aus p65 (auch bekannt als REL A), REL B, zytoplasmatischen (c) REL, p50 und p52 zusammen. Infolge der Phosphorylierung von I κ B wird dieses degradiert, so dass NF κ B in den Zellkern translozieren kann, wo es die Transkription überwiegend proinflammatorischer Mediatoren steuert [30]. Zu diesen NF κ B-regulierten Mediatoren gehören Zytokine wie

Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2), IL 6, IL 8, *monocyte chemotactic protein-1 (MCP1)* oder TNF α [42-46].

Neben dem IKK-Komplex phosphoryliert TAK1 auch die mitogen-aktiviertes Protein (MAP) Kinase Kinase (MKK) 3 und MKK6, welche wiederum die Jun N-terminale Kinase (JNK) und die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) p38 aktivieren. JNK und p38 aktivieren den Transkriptionsfaktor *activating-protein-1 (AP-1)*, welcher mittels Zytokininduktion die inflammatorische Antwort moduliert [28].

AP-1 ist ein Komplex aus Mitgliedern der Jun-, Fos-, *activating transcription factor (ATF)*- und Maf (*musculoaponeurotic fibrosarcoma*)-Proteinfamilie, welche verschiedene Homo- und Heterodimere ausbilden können. Je nach Kombination werden verschiedene Elemente der Promotorsequenz erkannt und die Transkription verschiedener Gene initiiert [47].

Der MyD88-abhängige Signalweg nach Stimulation von TLR2 und TLR4 wird neben MyD88 durch das Adapterprotein TIRAP vermittelt. So ließ sich bei TIRAP-Defizienz eine verminderte Antwort nach Stimulation von TLR2 und TLR4 nachweisen, die Antwort nach Stimulation von TLR5, 7 und 9 wurde jedoch nicht beeinflusst [48, 49].

1.2.1.2. MyD88-unabhängiger Signalweg

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass es neben dem MyD88-abhängigen Signalweg auch noch eine MyD88-unabhängige Signaltransduktion nach Stimulation von TLR4 gibt. So zeigten Makrophagen von MyD88-defizienten Mäusen keine inflammatorischen Zytokine wie IL 6 oder TNF α nach Stimulation mit Liganden für TLR2, TLR5, TLR7 und TLR9 [28]. Jedoch ließ sich in MyD88-defizienten Mäusen nach Stimulation von TLR4 mit Lipopolysaccharid (LPS) eine NF κ B-Aktivierung nachweisen, welche im Vergleich zu der Antwort im Wildtyp-Tier verzögert war [50]. Bei MyD88-defizienten Makrophagen ließ sich außerdem nach Stimulation mit LPS eine Aktivierung des IFN regulierenden Faktors (IRF3) und eine Induktion von IFN- β nachweisen [51, 52]. Diese war in Abwesenheit des Adapterproteins TRIF deutlich reduziert. Fibroblasten von MyD88- und TRIF-doppelt-defizienten Mäusen zeigten keinerlei NF κ B-Aktivierung nach Stimulation mit LPS [53]. Damit kommt es bei der MyD88-unabhängigen Signaltransduktion durch die Rekrutierung von TRIF zu einer Aktivierung von NF κ B und von IRF3. Die Aktivierung von IRF3 wird nach TLR4-Stimulation über das Adapterprotein TRIF durch das Adapterprotein TRAM vermittelt, da TRIF nicht direkt an TLR4 binden kann [54].

Neben TLR4 nutzt auch TLR3 den MyD88-unabhängigen Signalweg über TRIF. So zeigten TRIF-defiziente Mäuse keine NFκB Antwort nach TLR3-Stimulation [53]. Nach Stimulation von TLR3 wird über TRIF neben NFκB auch IRF3 aktiviert [52]. Die Aktivierung von IRF3 ist im Gegensatz zur Aktivierung nach TLR4-Stimulation unabhängig vom Adapterprotein TRAM [54] (Abbildung 1.1).

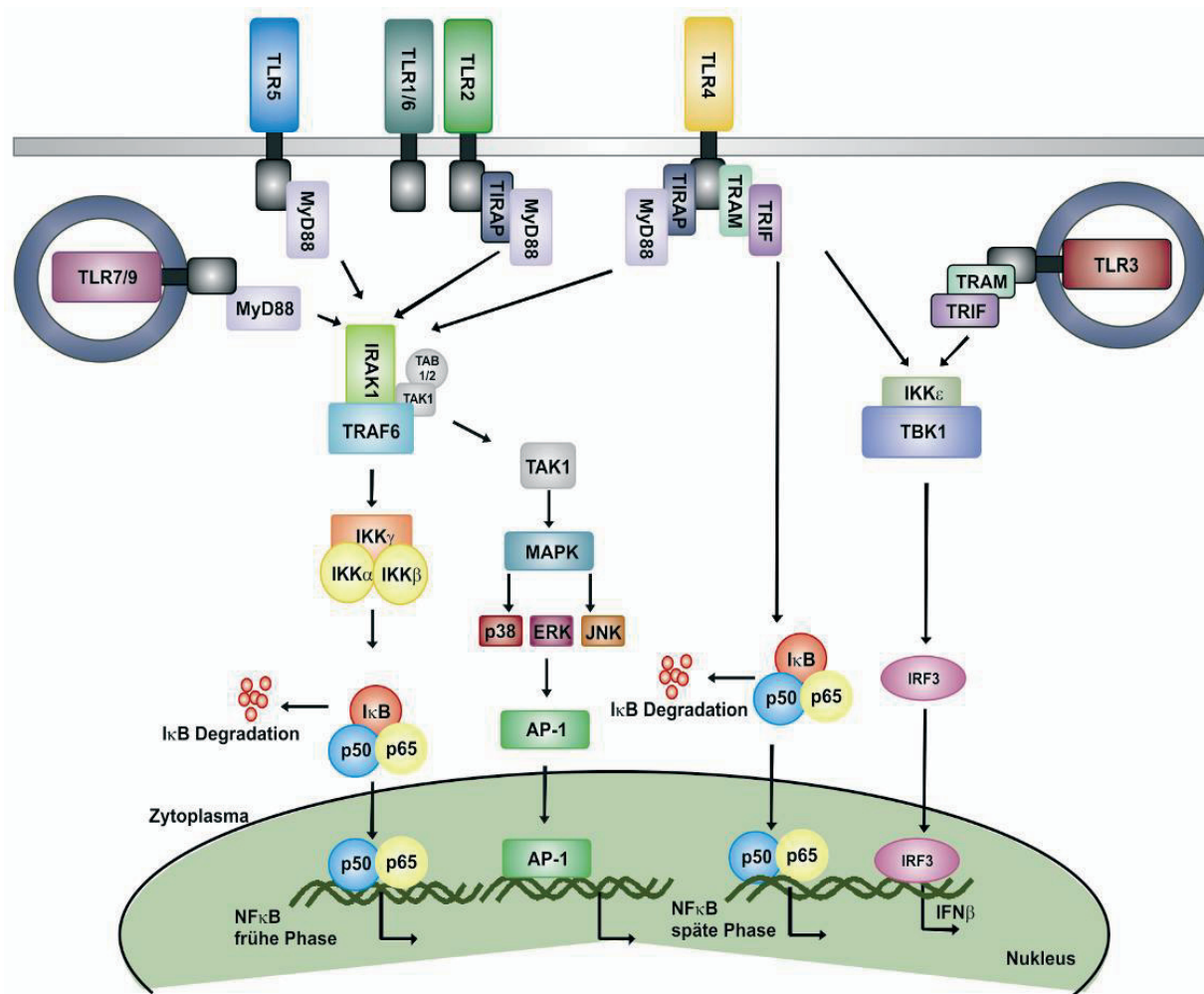


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion nach TLR-Stimulation

Nach Aktivierung des MyD88-abhängigen Signalwegs kommt es zur Rekrutierung von IRAK4, welches IRAK1 phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung kann TRAF6 binden und es kommt zur Aktivierung des TAK1/TAB1-3 Komplexes, welches den IKK-Komplex aktiviert. Die Aktivierung des IKK-Komplexes resultiert in der Degradation von IκB, wodurch NFκB frei wird und im Kern die Transkription von proinflammatorischen Mediatoren regulieren kann. TAK1 kann außerdem über die Phosphorylierung von MAPK den Transkriptionsfaktor AP1 aktivieren. Beim MyD88-unabhängigen Signalweg interagieren TLR3 oder 4 mit dem Adapterprotein TRIF, über das nach Signaltransduktion entweder die Aktivierung von NFκB oder IRF3 vermittelt wird.

AP-1: activating-protein 1; IKK: IκB-Kinase; IFNβ: Interferon β; IRF: IFN regulierender Faktor; IRAK: IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase; JNK: Jun N-terminale Kinase; MKK: mitogen-aktiviertes Protein Kinase Kinase; MyD88: myeloid differentiation factor 88; NFκB: Nuklearfaktor κB; TAB: TAK1-bindendendes-Protein; TAK1: *transforming-growth-factor-β*-aktivierten Kinase; TBK1: TRAF-associated NFκB activator; TLR: Toll-like Rezeptor; TIRAP: MyD88-adaptor-like; TRAF: Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6; TRAM: TRIF-related-adaptor-molecule; TRIF: TIR-domain-containing-adaptor Protein inducing interferon (IFN) β

(Modifiziert nach Akira 2005, Feng 2011, Pilsbury 2007 [30, 55, 56])

1.2.2. Toll-like Rezeptor 2

TLR2 erkennt Bestandteile von gram-positiven Bakterien wie Lipoteichonsäure, Lipoproteine und Peptidoglykan und spielt damit eine wesentliche Rolle in der Bekämpfung dieser Bakterien. Die große Vielzahl und Variabilität der Liganden wird dadurch gegeben, dass TLR2 Heterodimere mit TLR1 und 6 ausbildet. Anhand von TLR1- beziehungsweise TLR6-defizienten Makrophagen konnte gezeigt werden, dass das TLR2/1-Heterodimer triacetylierte bakterielle Lipopeptide und TLR2/6 diacetylierte bakterielle Lipopeptide erkennt [57]. Zu den Lipoproteinen, die von TLR2/1 erkannt werden, gehört auch das synthetische Lipoprotein-Analog Pam₃Cys-SK4 (Abbildung 1.3) [58, 59].

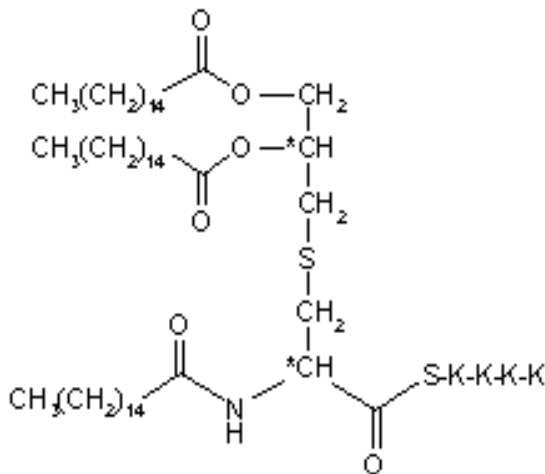


Abbildung 1.3: Pam₃Cys-SK4

Struktur des synthetischen Lipoprotein-Analog Pam₃Cys-SK4, welches an das Heterodimer TLR2/1 bindet. (<http://www.microcollections.de/>)

Nachdem ein Ligand an TLR2 gebunden hat wird via MyD88 und TIRAP über IRAK, TRAF6 und die Degradierung von IκB schließlich NFκB aktiviert (1.2.1.1). Neben dem Signalweg über IRAK und TRAF6 wurde gezeigt, dass durch Stimulation von TLR2 die Rho-GTPase Rac1 und die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) zum zytoplasmatischen Teil von TLR2 rekrutiert werden [60].

PI3K spielt bei Zellproliferation, Metabolismus und dem Überleben der Zelle durch die Phosphorylierung von bestimmten Phospholipiden der Zellmembran, den Phosphoinositiden, eine wichtige Rolle. Die PI3K besitzt eine C2-Domäne, welche Phospholipide bindet und so die PI3K zu Membranfraktionen rekrutieren kann, sowie eine katalytische Domäne. Es sind drei verschiedene Klassen von PI3Ks beschrieben. Klasse I PI3Ks

werden durch Rezeptor-Tyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Sie bilden Phosphatidyl (PI) 3-Phosphat (PI(3)P), PI3, 4 -Bisphosphat (PIP₂) und PI 3, 4, 5-Trisphosphat (PIP₃). Klasse I PI3Ks werden je nach Art der Aktivierung in vier verschiedene Subklassen unterteilt (I a-I d). Klasse II PI3Ks bilden PI(3)P und PI(3,4)P. Klasse III PI3Ks generieren lediglich PI(3)P. Klasse I und II PI3Ks besitzen zusätzlich eine Ras-bindende Domäne, die bei Klasse III fehlt [61, 62].

Klasse Ia Enzyme sind Heterodimere, die sich aus drei verschiedenen Typen der katalytischen Untereinheit p110 und fünf regulatorischen Untereinheiten zusammensetzen. Die katalytischen Untereinheiten setzen sich aus p110 α und p110 β , die in fast allen Geweben exprimiert werden und p110 δ , die primär bei Leukozyten vorkommt, zusammen. Die regulatorischen Einheiten sind p85 α , p55 α , p50 α , p85 β und p55 γ , wobei p85 α am stärksten exprimiert wird. Sowohl die p85 α als auch die p85 β Untereinheit besitzen 2 Src-Homologdomänen (SH2), die die katalytische Untereinheit p110 zu Tyrosin-phosphorylierten Proteinen an der Plasmamembran rekrutiert [62]. So vermittelt die direkte Interaktion der SH2-haltigen regulatorischen Einheit mit Phosphotyrosinresten die Aktivierung der katalytischen Einheit, die daraufhin PI3K aktiviert. Nach Aktivierung phosphoryliert PI3K an der Plasmamembran PIP₂ zu PIP₃, welches durch Signalproteine, die eine C-terminale Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne besitzen, erkannt wird. Zu diesen Signalproteinen gehören die Serin-Threonin-Kinase Akt (auch Proteinkinase B (PKB)) und die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1) [63]. Es sind drei verschiedene Isoformen der Serin-Threonin-Kinase Akt bekannt. Dies sind Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) und Akt3 (PKB γ), deren genetische Sequenz zu mehr als 85% identisch ist und deren Proteinprodukte die gleiche strukturelle Organisation aufweisen. Von den drei Isoformen dominiert Akt1 in den meisten Geweben [64]. PDK1 bindet an das nach Phosphorylierung entstandene PIP₃, wird dadurch aktiviert und kann wiederum Akt phosphorylieren. Nach Aktivierung fördert Akt das Überleben der Zelle, indem es unter anderem das Apoptose-induzierende *Bcl-2 associated Death* Promotor Protein (BAD) phosphoryliert, welches dadurch inaktiv wird und mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) durch Phosphorylierung aktiviert, wodurch es Zellwachstum und Proliferation fördert [63, 65].

Wie bereits erwähnt beschrieben Arbibe et al. eine Verbindung zwischen der Aktivierung von TLR2 und PI3K. Sie zeigten, dass es infolge der Stimulation zur Phosphorylierung von Tyrosinresten an der zytoplasmatischen Domäne von TLR2 kommt, welche die Assoziation

von TLR2 mit der Rho-GTPase Rac1 und der p85 Untereinheit von PI3K vermittelte und über die Phosphorylierung von Akt schließlich NFκB aktivierte [60]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass das Adaptermolekül TIRAP nach Stimulation des TLR2/6-Heterodimers mit dem Makrophagen-aktivierenden Lipoprotein (MALP) 2, einem diacetylierten bakteriellen Lipoprotein, direkt mit der p85α Einheit von PI3K interagiert und diese dann Akt phosphoryliert (Abbildung 1.4). Auch TLR2/1-Stimulation mit dem Liganden Pam₃Cys resultierte in einer Phosphorylierung von Akt. Diese war jedoch unabhängig vom TIRAP und MyD88 [66].

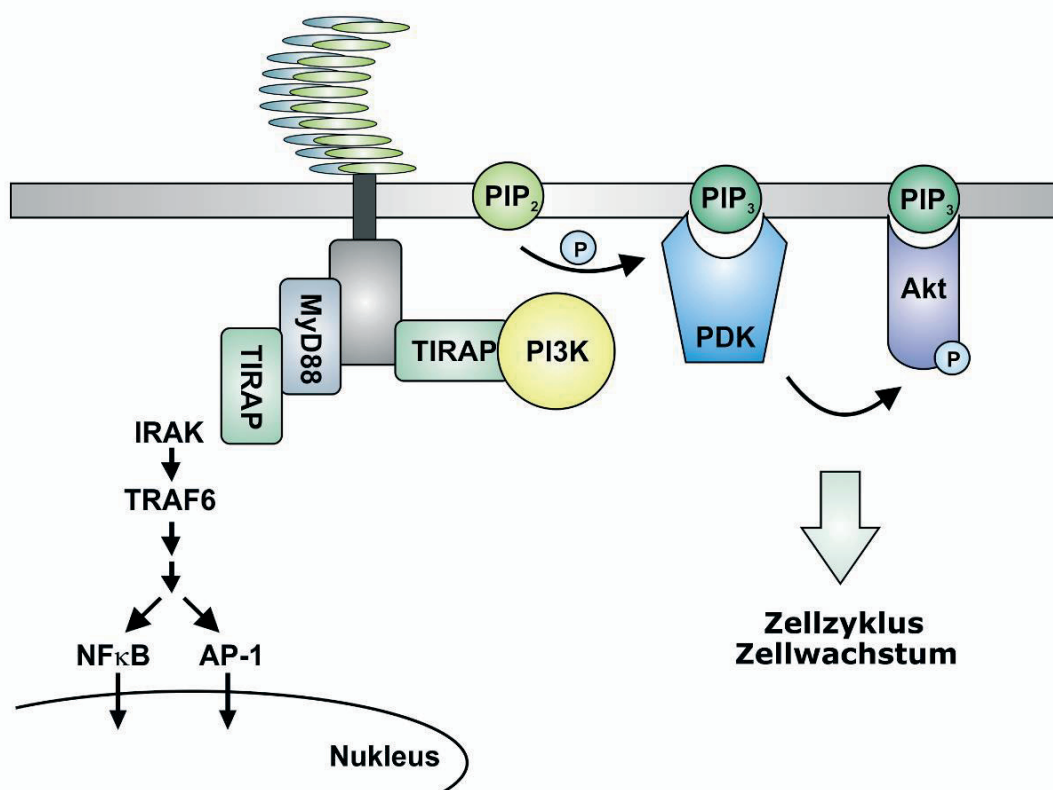


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des PI3K/Akt-Signalwegs nach TLR2-Aktivierung

Die Stimulation von TLR2 führt neben der Aktivierung des bekannten Signalwegs über IRAK und TRAF6 auch zur Interaktion des Adaptermoleküls TIRAP mit PI3K. Daraufhin phosphoryliert PI3K PIP₂ zu PIP₃, welches wiederum PDK bindet. Durch die Bindung an PIP₃ kann PDK Akt durch Phosphorylierung aktivieren. Akt greift nach Aktivierung fördernd in Zellzyklus und Zellwachstum ein. AP-1: activating-protein 1; IRAK: IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase; MyD88: *myeloid differentiation factor* 88; TRAF: Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-assoziierte Faktor; TIRAP: MyD88-adaptor-like; NFκB: Nuklearfaktor κB; PDK: Phosphoinositid-abhängige Kinase; PI3K: Phosphatidylinositol-3 Kinase; PIP₂: Phosphatidyl-bisphosphat; PIP₃: Phosphatidyl-trisphosphat

Auch für TLR3, TLR4 und TLR5 wurde eine Aktivierung von PI3K und Akt nach Stimulation beschrieben. So wurde mittels Immunopräzipitation gezeigt, dass nach LPS-Stimulation PI3K mit MyD88 assoziiert ist. Außerdem ließ sich die durch LPS induzierte IL-1 β -Antwort durch Inhibition von PI3K blockieren [67]. Rhee et al. zeigten, dass Stimulation von TLR5 mit Flagellin zur einer Aktivierung von PI3K führt, bei der die p85 Untereinheit von PI3K direkt mit dem Adaptermolekül MyD88 assoziiert war [68]. Die Inhibition von PI3K nach TLR3-Stimulation resultiert in einer verminderten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF-3. Damit spielt PI3K/Akt-Signalweg auch in der Signaltransduktion nach Stimulation von TLR3 eine Rolle [69].

1.2.3. Die Rolle von TLR2 während Myokardischämie/Reperfusion (MI/R)

Die Stimulation von TLR resultiert über die Phosphorylierung und Degradation von I κ B in einer Aktivierung von NF κ B (1.2.1). Der Transkriptionsfaktor NF κ B induziert daraufhin die Expression von Mediatoren für eine unmittelbare antimikrobielle Immunreaktionen sowie für die Inflamationsreaktion [70].

Neben der Rolle von TLRs bei der antimikrobiellen Abwehr, wird TLR4 und TLR2 auch eine Beteiligung bei der sterilen Inflammation beim Ischämie-/Reperfusionsgeschehen zugeschrieben. Dies lässt sich durch die Fähigkeit der TLRs, neben mikrobiellen exogenen Liganden auch endogene Liganden zu erkennen (1.2), erklären. So zeigten TLR2- und TLR4-defiziente Mäuse nach renaler Ischämie und Reperfusion eine geringere tubuläre Schädigung, geringere Zytokinspiegel sowie eine reduzierte neutrophile Infiltration [71, 72]. Des Weiteren wiesen TLR4-defiziente Mäuse eine geringere Schädigung nach Leberischämie/Reperfusion auf als vergleichbare Wildtyptiere [73]. Welche Liganden während renaler und hepatischer Ischämie an die TLRs binden, ist jedoch unbekannt.

Sowohl Untersuchungen am isolierten Rattenherz, als auch Ischämie/Reperusionsversuche im Rattenmyokard *in vivo* zeigten, dass durch Ischämie und Reperfusion die Aktivierung von NF κ B induziert wurde [74, 75]. In einer weiteren Studie konnte durch die Blockierung von NF κ B die Infarktgröße sowie die Inflammation nach MI/R reduziert werden [76].

Murine Kardiomyozyten exprimieren TLR2, 3, 4, 5, 7 und 9, wobei nur die Stimulation von TLR2, 4 oder 5 in einer Aktivierung von NF κ B resultiert [77].

Die am besten charakterisierten TLRs im Herzen sind TLR2 und TLR4. So ließ sich vier Tage nach Myokardinfarkt im Vergleich zu *sham*-operierten Tieren eine erhöhte Expression von TLR4-messengerRNA (mRNA) nachweisen [78]. TLR4-defiziente Mäuse wiesen außerdem eine reduzierte Infarktgröße auf. Neben der verminderten Infarktgröße ließ sich eine Reduktion der leukozytären Infiltration sowie eine geringere Ausbreitung des Komplementfaktors C3 nachweisen [79, 80].

Bei TLR2-defizienten Mäusen (TLR2^{-/-}) ließen sich ähnliche Effekte nachweisen. So zeigten TLR2^{-/-}-Mäuse ein verbessertes Überleben nach MI/R. Dabei ließ sich außerdem eine Reduktion der Infarktgröße, verminderte Zytokinspiegel von TNF α und IL 1 β , sowie reduzierte Myeloperoxidasespiegel (MPO), die einen Marker für aktivierte neutrophile Granulozyten darstellen, nachweisen [81-83]. Neben der reduzierten Inflammation zeigten TLR2^{-/-}-Mäuse auch funktionelle Vorteile nach M/IR. So ließ sich im Langendorff-Experiment am isolierten Mausherz eine verbesserte postischämische ventrikuläre Pumpfunktion sowohl bei TLR2- als auch bei TIRAP-Defizienz nachweisen [84]. Weiterhin wurden bei TLR2^{-/-}-Mäusen geringere Troponin T-Werte, die ein Maß für die Schädigung des Herzens darstellen, ebenso wie eine geringere Inzidenz bradykarder Rhythmusstörungen nachgewiesen [83, 85]. Favre et al. konnten zeigen, dass die kleineren Infarkte zusätzlich mit einer reduzierten endothelialen Dysfunktion assoziiert waren. Weiterhin wiesen sie im Infarktgebiet von Wildtyp-Tieren (WT) eine erhöhte ROS-Produktion nach, welche im TLR2^{-/-} nicht messbar war [82]. Die positiven Effekte der TLR2-Defizienz waren auch durch Applikation eines blockierenden Anti-TLR2 Antikörpers erzielbar. So zeigten Arslan et al. in mit Antikörper-behandelten Tieren eine Reduktion der Infarktgröße sowie eine geringere Infiltration von neutrophilen Granulozyten. Des Weiteren waren eine verbesserte Herzfunktion sowie kleinere Infarktnarben zu beobachten [86].

Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass sich die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs positiv auf das Überleben von Kardiomyozyten nach Hypoxie bzw. Ischämie/Reperfusion auswirkt. Dabei ließ sich durch Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs die Apoptoserate *in vitro* und *in vivo* reduzieren [87, 88]. Wie bereits oben erwähnt wird der PI3K/Akt-Signalweg auch durch TLRs aktiviert [60, 67].

Hua et al. zeigten, dass die Kardioprotektion, welche für TLR4-defiziente Mäuse (TLR4^{-/-}) beschrieben ist, durch den PI3K/Akt-Signalweg bedingt ist. So ergaben ihre Untersuchungen, dass die in TLR4^{-/-}-Mäusen gezeigte Reduktion der Infarktgröße nach MI/R durch die

Inhibition von PI3K aufgehoben werden konnte. Dies wurde einer geringeren myokardialen Apoptoserate zugeschrieben, welche nach Inhibition von PI3K sowohl in WT- als auch in TLR4^{-/-}-Tieren nach MI/R gesteigert war. Die Phosphorylierungsrate von Akt war bei den TLR4^{-/-}-Tieren bereits in der Kontrolle signifikant höher als im WT und ließ sich durch die Blockierung von PI3K reduzieren [89]. Die gleiche Gruppe zeigte eine Kardioprotektion bei WT-Tieren, die mit den TLR2-Liganden Peptidoglykan und Pam₃CysSK4 vorbehandelt wurden und dann MI/R ausgesetzt wurden. Dabei wiesen die WT-Tiere neben einer reduzierten Infarktgröße und einer verminderten Infiltration neutrophiler Granulozyten auch eine geringere kardiale Dysfunktion sowie bessere hämodynamische Parameter bezüglich Ejektionsfraktion oder Schlagvolumen auf. Die positiven Effekte ließen sich in TLR2^{-/-}-Tieren nicht nachweisen. Weiterhin konnte die Gruppe zeigen, dass es infolge der Peptidoglykan-Behandlung zu einer Assoziation von TLR2 und PI3K kam, sowie dass sich die protektiven Effekte der Behandlung durch Blockierung von PI3K oder bei Akt-defizienten Tieren aufheben ließen [90].

Die endogenen Liganden (siehe oben), die TLR2 oder TLR4 während MI/R aktivieren sind bisher nicht identifiziert. Mögliche Kandidaten wie zum Beispiel Biglykan, ein Molekül, das zu den Bestandteilen der extrazellulären Matrix gehört, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

1.3. Biglykan

1.3.1. Struktur und Funktion

Biglykan gehört zur Familie der *small leucine-rich proteoglycans* (SLRPs). SLRPs gehören zusammen mit Kollagenen, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Fibronektinen zu den Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Die Familie der SLRPs umfasst 17 verschiedene Gene und kann anhand von Homologien auf Protein- und Genomebene oder anhand chromosomaler Organisation in fünf verschiedene Klassen unterteilt werden. Die SLRPs bestehen aus einem *core protein*, welches LRRs beinhaltet. Daneben schließen die Merkmale der SLRPs N-terminale Cysteincluster und vier Cysteinreste ein, deren endständige Aminosäuresequenz die verschiedenen Klassen charakterisiert. Biglykan gehört zusammen mit Decorin zur Klasse I der SLRPs. Das *core protein* von Klasse I SLRPs besitzt 10 LRRs mit einer Länge von jeweils 20-29 Aminosäuren. Beide sind genetisch durch 8 Exons codiert und besitzen ein N-terminales Cysteincluster, welches durch zwei Disulfidbrücken verbunden ist.

Decorin enthält am N-terminalen Ende eine, Biglykan zwei Chondroitin-/ Dermatan-Sulfat-Seitenketten (Abbildung 1.5). Die Zusammensetzung der Seitenketten ist gewebspezifisch, so wird Chondroitinsulfat im Knochen und Dermatansulfat in Knorpel und Haut exprimiert [91-93].

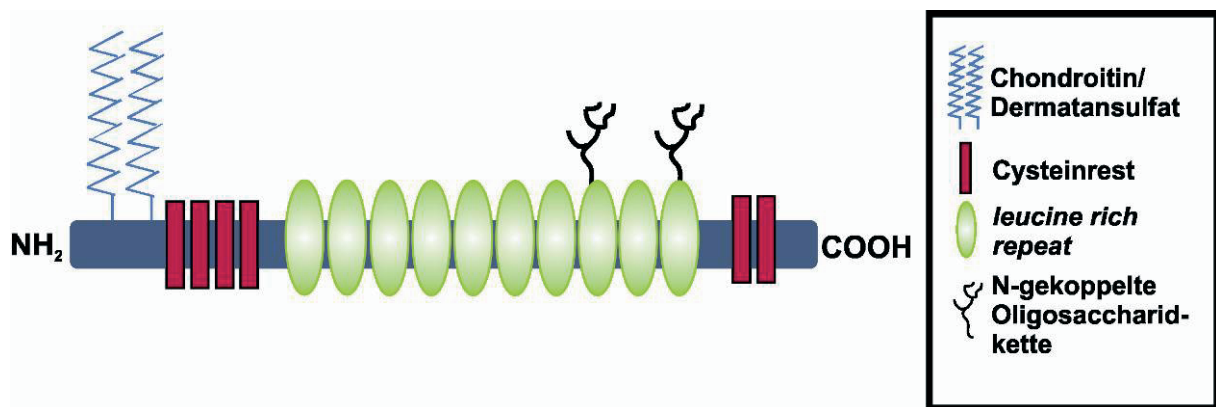


Abbildung 1.5: Biglykan

Biglykan besteht aus einem *core protein*, welches 10 *leucine rich repeats* (LRRs) enthält. Am N-terminalen Ende befindet sich ein Cysteincluster, welches aus vier Cysteinresten besteht und an das Chondroitin-/ Dermatansulfatketten gebunden sind. Am C-terminalen Ende befinden sich zwei weitere Cysteinreste. (modifiziert nach http://www.biocarta.com/pathfiles/m_slrppathway.asp)

Das Gen, welches Biglykan codiert, ist auf dem X-Chromosom lokalisiert [94]. Es wurde gezeigt, dass Biglykan sowohl an Kollagen Typ I-III als auch an Typ VI bindet und an der Ausbildung der fibrillären Struktur von Kollagen Typ I-III beteiligt ist [95, 96]. Biglykan-defiziente Mäuse zeigen in Form und Größe veränderte Kollagenfibrillen in Knochen, Dermis und Sehnen. Außerdem entwickeln sie im Alter von drei Monaten einen Osteoporose-ähnlichen Phänotyp mit verringerter Knochenmasse [97, 98].

Es ist bekannt, dass Proteoglykane in der Lage sind, mithilfe der Glykosaminoglykan (GAG)-Seitenketten an Wachstumsfaktoren wie den Plättchenfaktor 4 oder dem *core protein* an den Wachstumsfaktor *transforming growth factor* (TGF)- β zu binden [99]. Auch Biglykan bindet TGF- β , womit sich die Möglichkeit ergibt, dass es TGF- β in der extrazellulären Matrix sequestriert, um es vor möglichen Rezeptoren zu verbergen [100].

1.3.2. Biglykan und Myokardinfarkt

Verschiedene Studien konnten bereits nachweisen, dass Biglykan (Bgn) beim Myokardinfarkt eine Rolle spielt.

So beschrieben Yamamoto et al., dass die mRNA Expression von Bgn 7 Tage nach permanentem Infarkt hochreguliert war, sowie dass das Verteilungsmuster dem von $\alpha_1(I)$ -Kollagen mRNA entsprach [101]. Die höchste Signalintensität für Bgn-mRNA fand sich im Granulationsgewebe und in der Übergangszone zwischen nekrotischem und vitalem Gewebe. Bgn-positive Zellen waren in diesen Bereichen Fibroblasten-ähnliche Zellen und Endothelzellen, Kardiomyozyten waren nur schwach positiv [102]. Westermann et al. zeigten neben der erhöhten Bgn-Expression im Wildtyp (WT) funktionelle Einschränkungen nach permanenten Infarkt. Verglichen mit WT-Tieren kam es dabei bei Bgn-defizienten Mäusen häufiger zur Ruptur des linken Ventrikels. Weiterhin ließ sich nach 21 Tagen eine deutliche Dilatation des linken Ventrikels mit einem vermehrten enddiastolischen Volumen *in vivo* sowie eine reduzierte Dehnbarkeit des linken Ventrikels *ex vivo* nachweisen. Außerdem ergab die genaue Untersuchung des Infarktgebietes nach 7 und 21 Tagen eine gestörte Organisation der Kollagenfasern in der Infarktnarbe [103].

Neben der Bedeutung von Bgn nach permanentem Infarkt beschrieben Csont et al., dass die Inkubation von primären Kardiomyozyten mit Bgn vor bzw. während Hypoxie deren Mortalität in Abhängigkeit von der eingesetzten Bgn-Konzentration reduzierte [104].

1.3.3. Biglykan und TLR

Die Literatur gibt Hinweise darauf, dass Molekülen der extrazellulären Matrix eine Rolle bei der Aktivierung proinflammatorischer Signalwege durch PRRs zukommt [105, 106]. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Expression von Bgn durch proinflammatorische Signale beeinflusst wird. So zeigten Turfvesson et al., dass Bgn in Lungenfibroblasten durch Stimulation mit TNF α hochreguliert wird. Die gleiche Gruppe zeigte weiterhin, dass TNF α an das *core protein* binden und es so zur direkten Interaktion zwischen Bgn und dem Zytokin kommen kann [107, 108].

Schaefer et al. zeigten 2005, dass Stimulation mit Bgn sowohl TLR2 als auch TLR4 aktiviert. So ließ sich in TLR2 transfizierten *human embryonic kidney* (HEK) 293 Zellen eine vergleichbare NF κ B-Antwort auslösen, wie nach TLR2-Stimulation mit FSL-1, bzw. in TLR4 transfizierten

HEK293 Zellen eine vergleichbare Antwort wie nach LPS-Stimulation. Weiterhin konnte die Gruppe zeigen, dass Bgn-defiziente Mäuse sowohl einen Überlebensvorteil nach Sepsisinduktion mit Zymosan, einem TLR2-Agonisten, als auch nach LPS-induzierter Sepsis aufwiesen [35]. Des Weiteren konnte die Gruppe in einer anderen Studie zeigen, dass die Überexpression von Biglykan in der Maus durch Aktivierung von TLR2 und TLR4 eine Entzündungsreaktion auslöst. Diese war durch die vermehrte Proteinexpression von TNF α , IL 1 β oder des *monocyte chemotactic protein 1* (MCP1) im WT-Tier charakterisiert. Diese Zytokinantwort war in TLR2^{-/-} und TLR4^{-/-}, sowie TLR2/4-doppel-*knockout*-Mäusen signifikant reduziert [109]

1.4. Fragestellung

Die positiven Effekte der TLR2-Defizienz wurden bereits vielfach beschrieben [82, 83, 86]. Bislang ist jedoch der genaue Mechanismus, der dieser Protektion zugrunde liegt, nicht bekannt. Die Ergebnisse von Ha et al. geben Hinweise darauf, dass zwischen der Aktivierung von TLR2 und dem PI3K/Akt-Signalweg eine Verbindung besteht [90]. Ziel dieser Arbeit ist es, durch die Blockierung von PI3K und Akt während MI/R in TLR2^{-/-} und WT-Tieren, die Rolle dieses Signalwegs für die Kardioprotektion bei TLR2-Defizienz zu analysieren. Hierzu sollen zum einen die Auswirkungen der Blockierung von PI3K und Akt auf die Schädigung des Myokards in WT- und TLR2^{-/-}-Tieren, sowie die myokardiale Proteinexpression von PI3K und Akt und deren Phosphorylierungsgrad untersucht werden.

Neben dem genauen Mechanismus, ist bislang auch nicht bekannt, durch welche Liganden TLR2 im Verlauf von MI/R aktiviert wird und wodurch sich der protektive Effekt bei Defizienz erklären lässt. Bekannt ist, dass TLR2 neben den exogenen Liganden, welche meist mikrobiellen Ursprungs sind, auch endogene Liganden erkennt [37]. Schaefer et al. zeigten, dass dem SLRP Biglykan eine Rolle in der Aktivierung von TLR2 zukommt [35]. Ziel dieser Arbeit ist daher, die Rolle von Biglykan im Verlauf von MI/R zu untersuchen. Dabei sollen WT- und Bgn-defiziente Mäuse einer MI/R-Operation unterzogen werden. Nach 24-stündiger Reperfusion soll die Schädigung des Myokards quantifiziert werden.

Weiterhin soll ein Zellkultursystem etabliert werden, mit dem das Plasma von operierten Mäusen auf eventuell im Plasma enthaltene endogene Liganden für TLR2 untersucht werden kann. Hierzu sollen zunächst HEK Blue™ Zellen, die mit humanem (h) oder murinem (m) TLR2

transfiziert waren, mit dem Plasma operierter Mäuse stimuliert werden. Außerdem sollen auch zwei verschiedene monozytäre Zellsysteme (RAW264.7 Makrophagen und THP1X Blue™ Zellen) auf die Antwort nach Stimulation mit dem Plasma der Versuchstiere untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkultur

2.1.1.1. Lösungen und Medien für die Zellkultur

Reagenzien	Hersteller
Advanced D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco®-Invitrogen GmbH, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's phosphate buffered saline, steril	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
HEK-Blue™ Selection	Cayla - InvivoGen Europa, Toulouse, Frankreich
L-Glutamin	Gibco®-Invitrogen GmbH, Darmstadt
Normocin	Cayla - InvivoGen Europa, Toulouse, Frankreich
Penicillin/Streptomycin (10,000 U/ml Penicillin/ 10mg/ml Streptomycin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
QUANTI-Blue™	Cayla - InvivoGen Europa, Toulouse, Frankreich
RPMI 1640 (+L-Glutamin)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Zeocin™	Cayla - InvivoGen Europa, Toulouse, Frankreich

2.1.1.2. Materialien Zellkultur

Materialien	Hersteller
Kryoröhrchen	Nalgene-Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Milex GP Sterilfilter (0,22µm)	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts, Deutschland
Neubauer Zählkammer	LO – Laboroptik GmbH, Bad Homburg
2 ml Spritze	Terumo, Leuven, Belgien
Stripette 1, 5, 10, 25 ml, (Corning® Costar® Stripette®)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Zellkulturflasche 75 und 175 cm ²	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatte 6 Well (Corning® Costar® cell culture plate)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.1.2. OP/Organentnahme-Material

Materialien	Hersteller
Chirurgische Schere	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Gewebeschere nach Metzenbaum	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Halsey-Nadelhalter	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Lidsperrer nach Cook	Geuder AG, Heidelberg, Deutschland
Moria Iris-Pinzette, gebogen, gezähnt	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland

Microserrefine-Klemme, 4mm x 0,75 mm, gerade	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Microserrefine-Klemmen-Applikator	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Nadelhalter nach Castroviejo	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Seracor®, Polyester, 5/0	Serag Wiesner, Naila, Deutschland
Seralon®, Polyamid, 6/0	Serag Wiesner, Naila, Deutschland
Seralene®, Polyvinylidenfluorid, 7/0	Serag Wiesner, Naila, Deutschland
Injektionskanüle 30 G, 27G, 30 G (BD Microlance®)	Becton Dickinson GmbH Germany, Heidelberg, Deutschland
Introcane® Certo Venenverweilkatheter 24G	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Octeniderm® Hautdesinfektionsmittel	Schülke und Mayr, Norderstedt, Deutschland
1 ml Spritze (BD Plastipak®)	Becton Dickinson GmbH Germany, Heidelberg, Deutschland

2.1.3. Chemikalien

Alle Chemikalien waren kommerziell erhältlich und wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (Deutschland), Applichem, Darmstadt (Deutschland) oder Roth, Karlsruhe (Deutschland) bezogen.

Reagenzien/Kits	Hersteller
Biglykan aus bovinem Gelenkknorpel	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic®)	Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland
Evans Blue	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm®	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc, Californien, USA
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

Natriumchloridinjektionslösung	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Nitroblautetrazolium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pam ₃ Cys-SK4	EMC microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland
Pentobarbital (Narcoren®)	Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Protease-Inhibitor-Cocktail Tabletten	Roche, Mannheim, Deutschland
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland
Ringer	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Roti®Quant	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
Tri-Reagent®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
T-Per® Tissue Protein Extraction Reagent	Pierce, Rockford, USA
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland

2.1.4. Sonstiges Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Cellulose Chromatographie Papier (Grade 3MM Chr, 0,34 mm)	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Eppendorf-Röhrchen 1,5ml, 2ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einbettkassetten	Sanova, Leimen, Deutschland
Pipettenspitzen gelb, weiß, blau	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
Polypropylen-Röhrchen mit Schraubverschluss 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PVDF Western Blotting Membran	Roche, Mannheim, Deutschland

2.1.5. Geräte

	Gerät	Hersteller
Autoklav	Systec Tischaufoklav D-23	Systec GmbH, Wetztenberg, Deutschland
Beatmung	Intubationskanüle für Mäuse, Durchmesser 1.1 mm, Länge 28 mm	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
	Minivent®, Beatmungsgerät	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
Brutschrank	Hera Cell 150iCO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland
Heizgerät	HLC HeizThermoMixer MHR 23	DITABIS AG, Pfortzheim, Deutschland
Homogenisator	Precellys 24-Homogenisator	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Imager	Kodak Image Station 4000MM pro	Carestream Molecular Imaging, Woodbridge Connecticut, USA
Inkubator	Inkubator B15	Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland
Inverses Mikroskop	Leica DM IL LED	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kaltlichtquelle	KL 200	Schott AG, Mainz, Deutschland

Pipetten	Eppendorf Research®, verstellbar, multichannel	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Eppendorf Research®, verstellbar, singlechannel (10, 20, 100, 200, 1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Photometer	NanoPhotometer	Implen GmbH, München, Deutschland
Realtime-PCR	StepOnePlus™ Real-Time	Life Technologies PCR System GmbH, Darmstadt, Deutschland
Sonifizierer	Sonoplus HD 2070	Bandelin Electronic GmbH und Co. KG, Berlin, Deutschland
Spektrophotometer	µQuant™ Microplate Spectrophotometer	BioTek Germany, Bad Friedrichshall, Deutschland
Sterilbank Zellkultur	HERAsafe® Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland
Troponinmessung	Cardiac Reader	Roche, Mannheim, Deutschland
	Roche Cardiac Troponin T Quantitative- Teststreifen	Roche, Mannheim, Deutschland
Thermocycler	Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vakuumpumpe	HLC Vakuum-Sicherheits Absaugsystem AZ 02	DITABIS AG, Pfortzheim, Deutschland
Vortexer	Vortex Genie-2	Scientific Industries, Inc.

Wärmematte	Wärmematte	Bohemia, USA Witte+Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland
Wasserbad	Schüttelwasserbad OLS 200	Grant Scientific, Cambridgeshire, Großbritannien
Western Blot	Mini-PROTEAN Cell 3	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
	PowerPac™ Universal Power	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf MiniSpin®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Eppendorf Centrifuge 5417	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Eppendorf Centrifuge 5202	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Heraeus Multifuge 1 S-R	Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland

2.1.6. Software

Software	Hersteller
CorelDRAW Graphics Suite X5	Corel Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland
GraphPad Prism®-Software Version 5.02	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
EndNoteX5	Thomson Reuters, Carlsbad, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Microsoft Office 2007 (Word, Excel, Powerpoint)	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
SigmaScan pro Software	SPSS Inc., Chicago, USA

2.2. Puffer und Lösungen

Antikörper-Inkubationspuffer (Western Blot)

5% Bovines Serum Albumin (BSA) in TBST

***Blocking*-Puffer (Western Blot)**

3% BSA in TBST

DEPC-Wasser

dest. H₂O

0,1% DEPC

Ladepuffer (Western Blot)

dest. H₂O

10% Tris-HCl 500mM, pH 6,8

20% Glycerol

10% SDS

0,05% Bromphenolblau

10% β-Mercaptoethanol

Laufpuffer (Western Blot) 10x

50mM Sigma 7-9

0,384 Glycin

0,1% SDS

Ad 1L dest. H₂O

Radioimmunpräzipitation-Assay (RIPA)-Puffer

25mM Tris HCl pH 7,6

150mM NaCl

1% Natriumdesoxycholat

0,1% SDS

Sammegel 4% (Western Blot)

4% Bis-Acrylamid

20% Sammelgelpuffer

dest. H₂O

0,01% TEMED

0,1% Ammonium Persulfat (10%)

Sammelgelpuffer (Western Blot)

0,625 M Sigma 7-9

0,5% SDS

dest. H₂O

pH 6,8

TBS 10x

500 mM Tris

1,4 M NaCl

Ad 1L dest. H₂O

pH 7,2

TBST

100 ml TBS 10x

900 ml dest. H₂O

0,1% Tween 20

Transferpuffer (Western Blot)

25 mM Sigma 7-9

0,384 M Glycin

ad 1l dest. H₂O

20% Methanol

Trenngelpuffer (Western Blot)

1,875 M Sigma 7-9

0,5% SDS

dest. H₂O

pH 8,8

Trenngel 10% (Western Blot)

10% Bis-Acrylamid

20% Trenngelpuffer

dest. H₂O

0,01% TEMED

0,1% Ammonium Persulfat (10%)

2.3. Methoden

2.3.1. *In-vivo* Methoden

2.3.1.1. Mäuse

Die Versuche wurden mit adulten männlichen Tieren im Alter von 10 bis 16 Wochen durchgeführt.

Bei den Wildtyptieren handelte es sich um den Inzuchtstamm C57BL/6JRj. Die Tiere wurden von der Firma Janvier, St. Berthevin Cedex, Frankreich gezüchtet. Die Biglykan-*knockout* Tiere wurden von Frau Prof. Dr. Liliana Schäfer, Institut für Pharmakologie des Klinikums der Goethe-Universität Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt. Bei diesen Mäusen ist das Biglykan-Gen durch Einbau einer PGK-Neomycin Kasette inaktiviert [97]. Da das Gen für Biglykan auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, lautet die Schreibweise für den hier verwendeten männlichen *Knockout* Bgn^{-/o}. Bei den TLR2-*knockout* Mäusen handelte es sich um den Mausstamm B6.129-Tlr2^{tm1Kir}/J von Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA, bei dem über homologe Rekombination ein Neomycin-haltiger Vektor eingebaut wurde, der die Sequenz unterbricht, die den C-Terminus der extrazellulären Domäne sowie einen Teil der Transmembrandomäne von TLR2 codiert.

Alle Mäuse wurden mindestens drei Tage vor Versuchsbeginn in der „Zentralen Forschungseinrichtung“ (ZFE) des Universitätsklinikums Frankfurt am Main untergebracht. Dort wurden die Tiere in einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Wasser und Futter waren *ad libitum* vorhanden. Die Tierversuche waren unter dem Aktenzeichen F91/53 von dem Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt.

2.3.1.2. Myokardischämie/Reperfusionsmodell

Das Operationsmodell Myokardischämie mit nachfolgender Reperfusion wurde anhand der bereits mehrfach beschriebenen Methode durchgeführt [110].

Die Narkose wurde mit Pentobarbital (Narcoren®, 160 mg/ml Pentobarbital, Merial) eingeleitet. Die intraperitoneal applizierte Dosis betrug 90 mg/kg Körpergewicht. Die Analgesie während und nach dem Eingriff wurde durch die subkutane Injektion von 0,05 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin (Temgesic®, 0,324 mg Buprenorphinhydrochlorid/ml, Reckitt Benckiser) sichergestellt.

Nach Eintritt der Narkose wurde die Maus endotracheal intubiert (*Intubation Cannula for Mouse*, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, Durchmesser 1.1mm, Länge 28mm) und mit einer Atemfrequenz von 110/min mit einem Volumen von 9 µl/g Körpergewicht beatmet. Die F_{iO_2} betrug 80%. Für die Beatmung wurde ein MiniVent® Beatmungsgerät von Hugo Sachs Elektronik verwendet.

Nach der Intubation wurde die Maus in modifizierter Rechtsseitenlage (Abbildung 2.1) auf einer Wärmematte fixiert. Dabei wurde die Maus zunächst in Rückenlage mit beiden Vorderpfoten an der Unterlage fixiert, das Becken der Maus nach links gekippt und beide Hinterpfoten auf der linken Seite fixiert.



Abbildung 2.1: Maus in modifizierter Seitenlage

Die Körpertemperatur des Versuchstieres wurde während der OP regelmäßig rektal überprüft und mithilfe der Wärmematte konstant bei 37,0°C gehalten. Das OP-Feld wurde mit Octeniderm® desinfiziert und die Haut in Höhe des 4. Interkostalraums in *lateroventraler* Richtung durchtrennt. Der *M. pectoralis major* wurde abpräpariert und der *M. pectoralis minor* stumpf durchtrennt. Anschließend wurde der Thorax mit einem geschlossenen Nadelhalter nach Castroviejo punktiert und die Interkostalmuskulatur über dem Nadelhalter durchtrennt. Nach Eröffnen des Thorax wurde ein modifizierter Lidsperrer nach Cook in die Öffnung eingesetzt, bei dem beide Blätter um die Hälfte geschmälert wurden.

Nun wurde vorsichtig das Perikard vom Herzen entfernt, der *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) der linken Koronararterie unterhalb des linken Vorhofs identifiziert und mit einem monofilen Faden der Stärke 7/0 (Seralene®, Polyvinylidenfluorid, Serag Wiessner, Naila) umstochen. Danach wurden beide Fadenenden durch ein kurzes Stück Polyethylenschlauch gezogen und die Fadenenden über dem Polyethylenschlauch mit einer Microserrefine-Klemme (Micro Serrefine®, Fine Science Tools) so festgezogen, dass der Schlauch dem Herzen auflag (Abbildung 2.2). Der erfolgreiche Verschluss des RIVA wurde über das Erblassen des Myokards überprüft. Während der Ischämie wurde der Thorax mit

einer feuchten Mullkompresse abgedeckt, um das Austrocknen der freigelegten Muskulatur zu vermeiden.



Abbildung 2.2: Linkes Bild: Umstechen des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA). Rechtes Bild: Ligatur des RIVA mittels Microserrefine-Klemme.

Nach einer 30-minütigen Ischämie wurde die Klemme gelöst und die Reperfusion des Gewebes durch die Rotfärbung des zuvor blassen Areals optisch überprüft. Der Faden wurde bis zur Organentnahme im Herzen belassen (Abbildung 2.3).

Bei den *sham*-operierten Tieren wurde der Thorax für eine Stunde eröffnet und das Herz vom Perikard befreit.



Abbildung 2.3: Nach 30-minütiger Ischämie wird die Ligatur gelöst und der Faden im Myokard belassen.

Bei den Tieren mit 24-stündiger Reperfusion wurden die Fadenenden mithilfe eines „Luftknotens“ verknotet, welcher im Myokard belassen wurde. Weiterhin wurde bei diesen Tieren der Thorax mithilfe von zwei Einzelknopfheften unter Einschluss der 3. und 4. Rippe verschlossen. Hierfür wurde ein polyfiler Faden der Stärke 5/0 (Seracor®, Polyester, Serag Wiessner, Naila) verwendet. Vor dem endgültigen Verschluss wurde die Luft mithilfe eines Venenverweilkatheters und einer 1ml Spritze aus dem Thorax abgezogen. Die *Mm. pectorales* wurden reponiert und die Haut mit einer durchschlungen-überwendlich fortlaufenden Naht mit einem Faden der Stärke 6/0 (Seralon®, Polyamid, Serag Wiessner, Naila) verschlossen.

Sobald die Maus selbständig atmete, wurde sie von dem Beatmungsgerät getrennt und über eine Maske mit Sauerstoff versorgt. Der Tubus wurde entfernt, sobald sichergestellt war, dass die Maus regelmäßig und selbstständig atmete. Um eine ausreichende postoperative Flüssigkeitsversorgung sicherzustellen, wurden der Maus einmalig 500µl Ringer-Lösung subkutan appliziert.

Die Tiere für die Untersuchung des PI3K/Akt-Signalwegs wurden 1h vor OP mit jeweils 100µl 5% DMSO in PBS (Vehikel), 1mg/kg Körpergewicht Wortmannin oder 2mg/kg Akt Inhibitor V (Triciribine) intraperitoneal behandelt [89, 111]. Akt Inhibitor V und Wortmannin waren jeweils in 5% DMSO in PBS gelöst. Wortmannin ist ein Inhibitor für PI3K, der kovalent an die

ATP-Bindungsstelle der katalytischen p110 α Untereinheit von PI3K bindet [112]. Akt Inhibitor V ist ein Inhibitor, der selektiv die Phosphorylierung von Akt hemmt, ohne andere im Signalweg involvierte Kinasen wie PI3K zu beeinflussen [113]. Diese Tiere wurden nach 30-minütiger Ischämie und 4-stündiger Reperfusion terminiert.

2.3.1.3. Organentnahme

Bei den Tieren mit 2-, 15- und 30-minütiger sowie 2-stündiger Reperfusion verblieb die Maus intubiert und wurde während der gesamten Zeit beatmet. Bei den Tieren mit 2-stündiger Reperfusion wurde nach der Ischämie zusätzlich mit 50 μ l Pentobarbital nachdosiert, um die Narkose aufrechtzuerhalten.

Die Tiere mit 4-, 10- oder 24-stündiger Reperfusion erwachten aus der Narkose und wurden nach Ablauf der Reperfusionszeit in bereits beschriebener Art und Weise anästhesiert und intubiert. Zur Organentnahme wurde die Maus in Rückenlage fixiert. Danach wurde die Bauchhöhle in der *Linea Alba* und der Thorax lateral des Sternums eröffnet. Der bei der OP im Myokard verbliebene Ligaturfaden wurde erneut angezogen und so der RIVA erneut ligiert. Nun wurde die Maus über die *Vena cava inferior* entblutet. Dabei wurde das Blut mit einer Kanüle der Größe 23 G in eine heparinisierte Spritze entnommen.

Sobald das Tier erste Zeichen der Agonie zeigte, wurde es über den rechten Ventrikel mit Evans Blue perfundiert. Da der *Ramus interventricularis anterior* durch die Ligatur verschlossen war, färbte sich nur der durchblutete Teil des Herzens an, der nicht der Ischämie ausgesetzt war. So ließen sich das Infarktgebiet bzw. die „*area at risk*“ (AR) und das Gewebe, welches keine Ischämie ausgesetzt wurden, die „*area not at risk*“ (ANR) unterscheiden (Abbildung 2.4). Sobald die Maus vollständig mit Evans Blue perfundiert war wurde das Herz sofort entnommen, mit 0,9%iger Natriumchloridlösung (NaCl) gespült und mithilfe eines Skalpell in 5 ca. 1mm dicke Scheiben geschnitten. Die Vorhöfe sowie der rechte Ventrikel wurden verworfen.

Bei den Herzen, die zur mRNA (2.3.5.2)- oder Proteinanalyse (2.3.3.2) bestimmt waren, wurden sofort AR und ANR getrennt und in flüssigem Stickstoff „schockgefroren“. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Gewebe bei -80°C gelagert.

Das Blut wurde 7 Minuten bei 10 000 x g zentrifugiert. Das dadurch gewonnene Plasma wurde in flüssigem Stickstoff „schockgefroren“ und die zellulären Bestandteile des Blutes verworfen. Auch das Plasma wurde bis zur Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Die Scheiben der Herzen, bei denen die Infarktgröße bestimmt wurde, wurden zunächst von beiden Seiten fotografiert und danach für 25 Minuten bei 37°C mit Nitroblautetrazolium (NBT) inkubiert. Dieser Farbstoff färbt vitales Gewebe violett. Nach der Färbung wurden die Scheiben von beiden Seiten abfotografiert und zur histologischen Auswertung in 4% Paraformaldehyd fixiert.

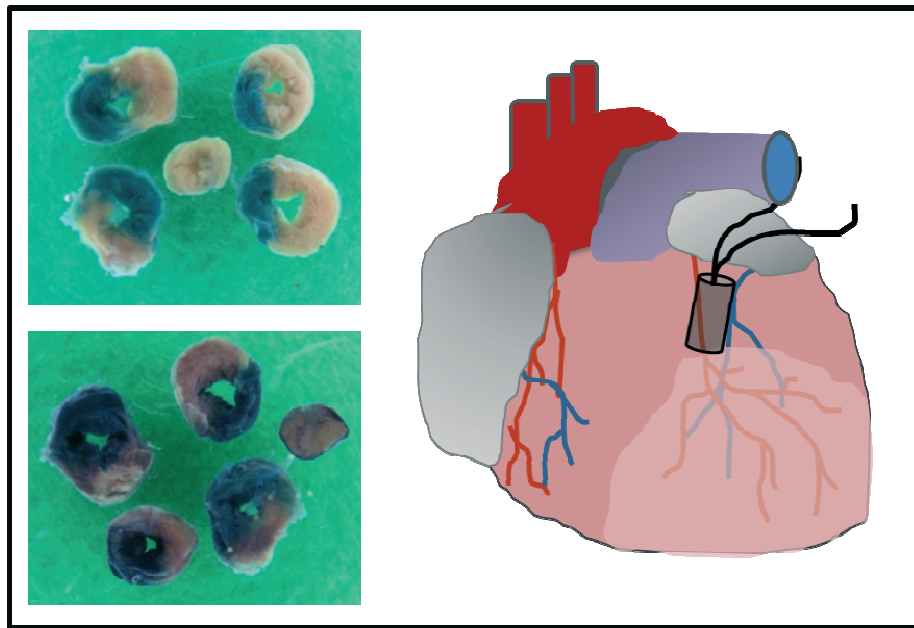


Abbildung 2.4: Herz nach Perfusion mit Evans Blue und nach Färbung mit NBT

Rechts: Schematische Darstellung des ischämischen Myokards nach Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA). Links oben: Herz in Scheiben nach erneutem Verschluss des RIVA und Perfusion mit Evans Blue. Links unten: Herzscheiben nach Vitalfärbung mit Nitroblautetrazolium.

2.3.1.4. Infarktgrößenbestimmung

Die Infarktgröße wurde mittels SigmaScan Pro Image Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ermittelt. Hierbei wurden AR und ANR sowohl auf den Fotos nach Evans Blue-Färbung als auch auf den Fotos nach NBT-Färbung auf Vorder- und Rückseite der „Herzscheiben“ ausgemessen. Die AR wurde als prozentualer Anteil des linken Ventrikels, die Infarktgröße (IS) relativ zur Größe der AR angegeben.

2.3.1.5. Troponin T-Messung

Für die Messung von Troponin T wurden der Cardiac Reader (Roche, Mannheim) und die dazugehörigen Teststreifen (Roche Cardiac Troponin T Quantitative- T; Roche, Mannheim) verwendet [85]. Die Methode beruht auf der Bindung von Troponin T an spezifische Antikörper. Die auf diese Weise entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe bilden in der sogenannten Nachweiszone eine rötliche „Signallinie“, deren Intensität mit steigender Troponin T-Konzentration zunimmt. Überschüssige Antikörper binden an die sogenannte „Kontrolllinie“. Diese dient als Positivkontrolle. Das optische System (CCD Photosensor) des Gerätes vergleicht die Intensität der Signallinie mit der Kontrolllinie. Nach ca. 15 Minuten erscheint das Ergebnis in ng/ml im Display des Gerätes. Das Probenvolumen pro Messung beträgt 150 µl.

Das Gerät gibt im Messbereich 0,1 ng/ml bis 2 ng/ml einen genauen Wert für Troponin T an, Werte ober- beziehungsweise unterhalb werden als *high* (HI) oder *low* (LO) angezeigt. Dies ist für die Diagnostik im klinischen Alltag ausreichend, da bei einem Wert von >2 ng/ml ein hohes Risiko für eine vorhandene Herzmuskelschädigung besteht. Um jedoch eine Relation zwischen Infarktgröße und kardialen Troponin T herzustellen, sind jedoch genauere Werte notwendig. Hierzu hat es sich bei vorangegangenen Studien bewährt eine 1:10 Verdünnung des Plasmas der operierten Maus mit Vollblut einer nativen Spendermaus herzustellen (15 µl Plasma der operierten Maus, 135 µl Vollblut der Spendermaus). Die Zugabe von Vollblut zum Plasma ist zudem notwendig, da das Gerät nur zur Messung von Troponin in Vollblut geeignet ist.

2.3.2. Zellbiologische Methoden

2.3.2.1. Zellkultur

RAW 264.7-Medium DMEM versetzt mit:
10% FCS (fetal calf serum)
2mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

HEK-Blue™ Null-Medium DMEM versetzt mit:
10% FCS (hitzeinaktiviert)
2mM L-Glutamin
50 U/ml Penicillin
50 µg/ml Streptomycin
100 µg/ml Normocin™
100 µg/ml Zeocin™

HEK-Blue™ hTLR2-Medium DMEM versetzt mit:
10% FCS (hitzeinaktiviert)
2mM L-Glutamin
50 U/ml Penicillin
50 µg/ml Streptomycin
100 µg/ml Normocin™
1 x HEK-Blue™ Selection

HEK-Blue™ mTLR2-Medium siehe HEK-Blue™ hTLR2 Medium

THP1X Blue™-Medium	RPMI 1640 (mit L-Glutamin) versetzt mit: 10% FCS (hitzeinaktiviert) 2mM L-Glutamin 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 200 µg/ml Zeocin™
---------------------------	--

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Die HEK- und RAW 264.7-Zellen wurden zweimal wöchentlich bei ca. 80% Konfluenz „gesplittet“. Hierzu wurden die RAW 264.7-Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und in Zellkulturmedium suspendiert. Sowohl die HEK-Blue™ Null- als auch die HEK-Blue™ hTLR2 Zellen ließen sich schon durch Schütteln der Zellkulturflasche lösen und in Suspension bringen. Dann wurden je 10% der Zellsuspension in einem Reaktionsgefäß 4 Minuten bei 400 x g zentrifugiert, das Medium verworfen und das Pellet je Größe der Flasche in 10 bis 20ml RAW 264.7-Zellkulturmedium bzw. HEK-Blue™ Null- oder HEK-Blue™ hTLR2-Zellkulturmedium aufgenommen. Die übriggebliebene Zellsuspension wurde verworfen.

Bei den THP1X Blue™ Zellen handelt es sich um Suspensionszellen. Sie wurden 2mal wöchentlich bei einer Konzentration von maximal 2×10^6 Zellen/ml gesplittet. Hierbei wurde zunächst die Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt und dann 5×10^5 Zellen/ml in neues Medium überführt.

2.3.2.2. Kryokonservierung

Für die Langzeitkonservierung der Zelllinien in flüssigem Stickstoff wurden die adhärenenten Zellen einer mittleren Zellkulturflasche wie oben beschrieben suspendiert und 4 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Danach wurde das Medium verworfen. Die HEK-Blue™- und RAW-Zellen wurden in 1ml Zellkulturmedium resuspendiert, welches 20% FCS, 10% DMSO und keinen Antibiotikazusatz enthielt.

Das Medium für die Kryokonservierung der THP1X Zellen bestand aus RPMI 1640 Medium, welches mit 20% FCS und 10% DMSO versehen wurde.

Bei diesen Zellen wurde die Zellsuspension einer mittleren Zellkulturflasche 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert und dann in 1ml Medium suspendiert.

Nachdem die Zellen resuspendiert wurden, wurde je 1ml in ein Kryoröhrchen pipettiert und diese sofort für 24 Stunden bei -80°C eingefroren. Danach wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff gelagert.

2.3.2.3. Auftauen von Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort in 15ml auf 37°C vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt. Dann wurden die THP1X Blue Zellen 5 Minuten bei 300 x g, die anderen Zelllinien 4 Minuten bei 400 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und danach das Pellet in 10ml vorgewärmten Zellkulturmedium aufgenommen.

Die THP1X Blue Zellen sowie die HEK-Blue™ Null- und HEK-Blue™ hTLR2 Zellen wurden während der ersten beiden Passagen nach dem Auftauen ohne selektives Antibiotikum (Zeocin™ bzw. HEK-Blue™ Selection) kultiviert.

2.3.2.4. Stimulation der Zelllinien

Für die Gewinnung von Gesamt-Protein oder -RNA wurden die Zellen auf 6-well Zellkulturplatten ausgesät (Tabelle 2) und vor der Stimulation 48 Stunden in normalem Zellkulturmedium (2.3.2.1) kultiviert. 24 Stunden vor der Stimulation wurde das Medium entfernt, der Zellrasen einmalig mit PBS gespült und das Medium durch FCS-freies Zellkulturmedium ersetzt. Je nach Stimulation wurden die Zellen 2-24 Stunden stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Die Zellen, die für die Untersuchung der RNA bestimmt waren, wurden in 1ml Tri-Reagent® suspendiert und anschließend bis zur RNA-Isolation bei -20°C eingefroren. Die Zellen, die für die Proteinisolation bestimmt waren, wurden in 200µl Radioimmunpräzipitation-Assay (RIPA)- Puffer gelöst und die Proteine gleich im Anschluss isoliert (2.3.3.1).

Tabelle 2: Zellzahl pro Well auf 6 well-Zellkulturplatte

Zelllinie	Medium	Zellzahl/Well
RAW 264.7	1 ml	1×10^6
HEK-Blue™ hTLR2	1 ml	4×10^5
HEK-Blue™ Null	1 ml	4×10^5

2.3.2.5. Messung der SEAP Aktivität mittels QUANTI-Blue™ zur Bestimmung der NFκB Aktivierung

Die HEK-Blue™ Zellen (Cayla - InvivoGen Europa, Toulouse, Frankreich) sind mit einem *secreted alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene* transfiziert, welches an den NFκB-Promotor gekoppelt ist. Somit wird bei einer Aktivierung von NFκB alkalische Phosphatase gebildet und sezerniert. Die HEK-Blue™ hTLR2 Zellen sind zusätzlich mit humanem TLR2 (hTLR2) transfiziert. Werden nun die hTLR2 transfizierten Zellen mit einem potentiellen TLR2 Liganden stimuliert, sollte NFκB aktiviert und SEAP sezerniert werden. Gleiches gilt für die HEK-Blue™ mTLR2 Zellen, die mit murinem TLR2 transfiziert sind. Als Negativkontrolle dienen die HEK-Blue™ Null Zellen, welche kein TLR2 exprimieren. Wird bei ihnen nach Stimulation SEAP nachgewiesen, war die Aktivierung von NFκB nicht TLR2-abhängig.

Die THP1X Blue™ Zellen basieren auf dem gleichen Prinzip, exprimieren aber zusätzlich zu TLR2 auch TLR4, was bei den HEK-Blue™ Zellen nicht der Fall ist.

Zur Stimulation der HEK-Blue™ Zellen wurden je well 50 000 Zellen auf eine 96 well-Platte in je 180µl FCS-freiem Zellkulturmedium ausgesät. Danach wurden die Zellen für 24 Stunden stimuliert.

Bei der Stimulation der THP1X Blue™ Zellen (Cayla - InvivoGen Europa, Toulouse, Frankreich) wurde eine Zellsuspension aus FCS-freiem Zellkulturmedium mit 2×10^6 Zellen/ml hergestellt und davon auf einer 96 well-Platte je 100µl per Well ausgesät. Danach wurde auch hier für 24 Stunden stimuliert.

Die Aktivität der durch die nach der Aktivierung von NFκB freigesetzte SEAP wurde mit Hilfe von QUANTI-Blue™-Detektionsmedium gemessen.

Hierzu wurde zunächst 1 Beutel QUANTI-Blue™ gemäß der Angaben des Herstellers in 100ml destilliertem Wasser gelöst und die Lösung mit einem 0,22µm Filter steril filtriert.

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden von diesem Medium jeweils 180µl pro *well* auf eine sterile 96 *well*-Zellkulturplatte pipettiert und auf 37°C erwärmt. Danach wurden jeweils 20µl des Mediums der stimulierten Zellen zu den 180µl QUANTI-Blue™-Detektionsmedium gegeben und bei 37°C inkubiert.

Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde wurde die Intensität des Farbumschlags, der ein Maß für die sezernierte Menge an alkalischer Phosphatase ist, mithilfe der Bestimmung der optischen Dichte (OD) im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 620nm gemessen.

2.3.3. Proteinbiochemische Analysen

2.3.3.1. Proteinisolation Zellen

Nach der Stimulation auf der 6 *well*-Platte wurde das Medium entfernt, die Zellen in je 1ml PBS aufgenommen und 4 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet mit 200µl kaltem RIPA-Puffer (2.2) mit je 8µl Proteinase-Inhibitor (25X) lysiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat sonifiziert und 15 Minuten bei 13 000 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde verworfen, der Überstand bis zur Proteinbestimmung bei -20°C gelagert.

2.3.3.2. Proteinisolation Herz

AR und ANR wurden zunächst abgewogen, mit 20µl T-Per® *Tissue Protein Extraction Reagent*/mg Gewebe versetzt und homogenisiert. Anschließend wurde das homogenisierte Material sonifiziert und 5 Minuten bei 10 000 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand bis zur Proteinbestimmung bei -20°C gelagert.

2.3.3.3. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Proben aus Zellstimulation wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt [114]. Hierbei nutzt man die Tatsache, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 an Protein bindet und so vom kationischen in den anionischen Zustand überführt wird. Dabei ändert sich die Absorptionswellenlänge von 470nm zu 595nm. Diese Absorptionsänderung ist proportional zur eingesetzten Proteinmenge und kann daher zur

Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt werden. Da die Bindung an den Farbstoff nicht für alle Proteine gleich ist, wurde zunächst eine Standardkurve mit bekannten Proteinkonzentrationen mit bovinem Serum Albumin (BSA) erstellt (Tabelle 3). Das Bradford Reagenz wurde aus Roti®Quant-Lösung hergestellt, welche im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde. Von dieser Lösung wurden je 200µl/well auf eine 96 well-Platte pipettiert. Die Proteinproben wurden 1:25 mit destilliertem Wasser verdünnt. Je well wurden 10µl Protein oder BSA-Standard zum Bradford Reagenz gegeben und die Absorption der Proben bei 595nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde dann anhand der Standardkurve berechnet.

Tabelle 3: Standardreihe für Proteinbestimmung nach Bradford

dest. H ₂ O [µl]	BSA (10mg/ml) [µl]	Konzentration mg/ml
900	100	1
910	90	0,9
920	80	0,8
930	70	0,7
940	60	0,6
950	50	0,5
960	40	0,4
970	30	0,3

Die Proteinkonzentration der Proteinlysate aus dem Gewebe der AR und ANR wurden mit dem Nanophotometer gemessen, da die vorangegangene Färbung der Herzen mit Evans Blue zu Verfälschungen bei der Bestimmung nach Bradford führt.

2.3.3.4. SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Zunächst wurde ein 10%-iges Trenngel (2.2) gegossen und mit 2-Propanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das 2-Propanol abgegossen, das 4%-ige Sammelgel (2.2) über das Trenngel gegossen und ein Kamm mit 10 oder 15 Zähnen eingesetzt.

Es wurden jeweils 20µg Protein eingesetzt. Die zu analysierenden Proteinproben wurden im Verhältnis 5:1 mit 5-fach konzentriertem Ladepuffer (2.2) versetzt, auf ein Gesamtvolumen

von 20µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt und 5 Minuten auf 96°C erhitzt, um die Proteinstruktur zu denaturieren. Danach wurden die Proteine mit der Mini-PROTEAN Cell 3 Apparatur bei 120 Volt in Laufpuffer aufgetrennt. Als Größenmarker wurden der Spectra™ *Multicolor Broad Range Protein Ladder* und der MagicMark™ XP Western Protein Standard auf das Gel aufgetragen.

2.3.3.5. Western Blot Analyse

Der Transfer dient dazu, die zuvor im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran zu übertragen. Hierzu wurde die PVDF-Membran vor dem Transfer mit Methanol aktiviert und auf das Gel gelegt. Gel und Membran wurden dann zwischen je zwei, mit Transferpuffer angefeuchtete Blätter Filterpapier und je einen Transferpuffer getränkten Schwamm in die Blotting Kassette gelegt, welche in die Mini Trans-Blot Cell Apparatur eingesetzt wurde. Der Transfer erfolgte dann 2 Stunden bei 100 Volt in Transferpuffer.

Der Erfolg des Transfers wurde durch die Färbung der auf die Membran transferierten Proteinbanden mit Ponceau S Lösung überprüft.

Nach dem Transfer wurde die Membran für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler mit Blockingpuffer (2.2) geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu maskieren.

2.3.3.6. Immundetektion

Nach dem Blocken wurde die Membran 3mal je 10 Minuten mit TBST (2.2) auf dem Horizontalschüttler gewaschen. Primäre Antikörper wurden in Antikörper-Inkubationspuffer verdünnt (Tabelle 4) und über Nacht bei 4°C mit der Membran auf dem Horizontalschüttler inkubiert.

Danach wurde die Membran 3mal mit TBST gewaschen und anschließend für eine Stunde mit einem HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppeltem Sekundärantikörper (Tabelle 5) bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Auch die Sekundärantikörper wurden in Antikörper-Inkubationspuffer verdünnt eingesetzt.

Vor der Detektion wurde die Membran 3mal je 10 Minuten mit TBST und 1mal 5 Minuten mit TBS (2.2) gewaschen.

Für die Detektion der Proteinbanden wurde ein Chemolumineszenzverfahren angewendet. Hierzu wurden zunächst Lösung A und B des „*Western Blotting Luminol Reagent*“ (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland) im Verhältnis 1:1 vermischt und die Membran mit dieser Lösung inkubiert. Die durch die Reaktion der Antikörper-gekoppelten HRP mit dem Luminol-Reagenz entstandene Chemolumineszenz wurde im Imager (Kodak Image Station 4000MM Pro) detektiert. Die Belichtungszeit im Imager lag je nach zu detektierendem Protein zwischen 5 und 15 Minuten.

Durch die Nutzung der PVDF-Membran war es möglich mehrere Proteine auf einer Membran zu detektieren. Hierfür musste die Membran zunächst durch 10-minütiges „Stripping“ mit „*Restore™ Western Blot Stripping Buffer*“ (Thermo Fisher Scientific, Bonn) bei 37°C auf dem Schüttler vom Primärantikörper befreit werden. Nach dem „Stripping“ wurde die Membran 5 Minuten mit TBS gewaschen. Vor der Inkubation mit dem nächsten Primärantikörper wurde die Membran 30 Minuten geblockt.

Tabelle 4: Primärantikörper Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Akt (polyklonal, <i>rabbit</i>)	1 : 1000	Cell Signalling/New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti-phospho Akt (Ser473) (polyklonal, <i>rabbit</i>)	1 : 1000	Cell Signalling/New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti β -Aktin (sc-47778) (monoklonal, <i>mouse</i>)	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Anti-ERK1/2 (p44/42 MAPK) (polyklonal, <i>rabbit</i>)	1 : 1000	Cell Signalling/New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti-phospho-ERK1/2 (p44/42 MAPK) (Thr0202/ Tyr204) (polyklonal, <i>rabbit</i>)	1 : 1000	Cell Signalling/New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti-GAPDH (polyklonal, <i>rabbit</i>)	1 :1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Anti-IkB α (monoklonal, <i>rabbit</i>)	1 : 1000	Cell Signalling/New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti-phospho-IkB α (Ser32)	1 : 1000	Cell Signalling/New England Biolabs

(monoklonal, <i>rabbit</i>)		GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti PI3 Kinase p85 (polyklonal, <i>rabbit</i>)	1 : 1000	Cell Signalling/New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti-phospho-PI3K p85 (Ty485)/p55(Tyr199) (polyklonal, <i>rabbit</i>)	1 : 1000	Cell Signalling/New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti-TLR 2 (polyklonal, <i>goat</i>)	1 : 500	R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, UK

Tabelle 5: Sekundärantikörper Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
<i>goat-anti-rabbit</i> IgG-HRP	1 : 5000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
<i>rabbit-anti-goat</i> IgG, polyklonal	1 : 1000	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland
<i>goat-anti-mouse</i> IgG, polyklonal	1 : 1000	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland

2.3.4. Auswertung der Western Blots

Die Auswertung der Western Blots wurde mittels ImageJ Software durchgeführt. Die detektierte Proteinexpression wurde entweder gegen GAPDH oder gegen β -Aktin normalisiert.

2.3.5. Präparation und Isolation von RNA aus Zellen

2.3.5.1. Isolation der Gesamt-RNA aus Zellen

Die Gesamt-RNA wurde nach Angaben des Herstellers mittels Tri-Reagent® isoliert. Hierzu wurde nach Ablauf der Stimulation der Zellen auf der 6-well-Platte das Medium entfernt und die Zellen in 1-1,5ml Tri-Reagent® aufgenommen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden je verwendetem Milliliter Tri-Reagent® 200 μ l Chloform

hinzugefügt, 15 Sekunden gevortext und das Gemisch für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die RNA-haltige wässrige Phase von der DNA-haltigen Interphase und der proteinhaltigen Phenolphase zu trennen, wurde nun für 15 Minuten bei 12 000 x g und 4°C zentrifugiert. Dann wurde die wässrige Phase in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt, die darin enthaltene RNA mit Isopropanol (500µl pro ml Tri-Reagent®) für 15 Minuten bei Raumtemperatur gefällt und das Präzipitat 15 Minuten bei 12 000 x g bei 4°C abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde 3mal mit 70% Ethanol in DEPC-H₂O gewaschen, getrocknet und anschließend je nach RNA-Menge in 20-50µl DEPC-Wasser gelöst. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260-280nm gemessen und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.5.2. Isolation der Gesamt-RNA aus Gewebe

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus den Mausherzen wurden 100mg Gewebe mit 1ml Tri-Reagent® versetzt, homogenisiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Homogenisat für 10 Minuten bei 4°C und 11 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200µl Chloroform versetzt. Die weiteren Isolationsschritte wurden analog zur Isolation der Gesamt-RNA aus Zellen (2.3.5.1) durchgeführt.

2.3.5.3. Aufreinigung der Gesamt-RNA

Die RNA-Proben wurden mittels RNeasy® Mini-Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Hierzu wurden zunächst 25µl RNA mit 2,5µl DNase und 10µl RDD-Digestionspuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15 Minuten wurden je Reaktion erst 350µl RLT-Lysispuffer, dann 250µl 100% Ethanol zugefügt, die Probe auf ein RNeasy Mini spin column überführt und 30 Sekunden bei 12 000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und die Silika-Membran des RNeasy Mini spin column 3mal mit RPE-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran durch Zentrifugation (14 000 x g, 1 Minute) getrocknet und für 15 Minuten mit 30µl DEPC-H₂O inkubiert, um die aufgereinigte RNA zu lösen. Danach wurde die gelöste RNA durch Zentrifugation (12 000 x g, 2 Minuten) des RNeasy Mini spin columns zurückgewonnen und die Konzentration photometrisch bei einer

Wellenlängen von 260-280nm gemessen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

2.3.5.4. Reverse Transkription

Um die isolierte *messenger* RNA (mRNA) mittels Polymerasekettenreaktion zu quantifizieren, musste die mRNA zunächst mittels reverser Transkription in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels iSkript™ cDNA Synthese Kit nach Anweisungen des Herstellers. Dabei wurde 1µg der isolierten mRNA mit 4µl 5x iScript Reaktionsmix und 1µl Reverse Transkriptase vermischt. Der Ansatz wurde mit nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 20µl aufgefüllt und zunächst für 5 Minuten bei 25°C, dann für 30 Minuten bei 42°C inkubiert. Zum Schluss wurde das Reaktionsgemisch für 5 Minuten auf 85°C erhitzt um das Enzym zu inaktivieren. Die cDNA wurde mit 100µl nuklease-freiem Wasser aufgefüllt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.3.5.5. Quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

Bei der herkömmlichen PCR werden mit Hilfe einer DNA-Polymerase bestimmte Bereiche der cDNA amplifiziert. Diese Bereiche werden durch den Einsatz von jeweils einen spezifischen „forward“- und einen spezifischen „reverse“-Primer eingegrenzt. Bei der quantitativen PCR wird zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green I) eingesetzt, der an doppelsträngige DNA bindet. Im Verlauf der PCR nimmt die Menge an doppelsträngiger DNA zu, was mit einem messbaren Fluoreszenzanstieg des gebundenen Farbstoffes einhergeht. Da jedes PCR-Produkt eine spezifische Schmelztemperatur besitzt, bei der 50% der doppelsträngigen DNA als Einzelstrang vorliegen, sollten möglichst alle PCR-Produkte im Ansatz die gleiche Schmelztemperatur aufweisen. Um dies zu überprüfen, wird die Temperatur kontinuierlich von 58°C auf 95°C erhöht und eine Schmelzkurve für die amplifizierten Fragmente erstellt.

Für die quantitative PCR wurden je Reaktion 2µl cDNA verwendet, welche mit jeweils 0,18µl „forward“ und „reverse“ Primer, 10µl 2x Power SYBR® Green PCR Master Mix und 7,64µl nuklease-freiem Wasser angesetzt wurden. Die verwendeten Primer wurden aus einer Primer-Datenbank ausgewählt [115]. Die Sequenzen der verwendeten Primer ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Die PCR wurde mit dem StepOne™Plus System durchgeführt, wobei folgendes Schema verwendet wurde:

40 Zyklen	1. Enzym-Aktivierung	95°C	10 Minuten
	2. Denaturierung	95°C	15 Sekunden
	3. Annealing/Extension	60°C	1 Minute
	4. Schmelzkurvenbestimmung		

Tabelle 6: Primer

Primer	Primersequenz	Produktlänge
18S (human) forward	5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGCAT-3'	187 bp
18S (human) reverse	5'-AGCGCCCGTCGGCATGTATT-3'	
CXCL2 (human) forward	5'-AAAAGGGGTTCCCGTTCTCG-3'	105 bp
CXCL2 (human) reverse	5'-ATGGGGCTCAGCAGGCGGT-3'	
IL6 (human) forward	5'-AATTCGGTACATCCTCGACGG-3'	113 bp
IL6 (human) reverse	5'-TTGGAAGGTTCAAGTTGTTTTCT-3'	
IL8 (human) forward	5'-TTTTGCCAAGGAGTGCTAAAGA-3'	194 bp
IL8 (human) reverse	5'-AACCCTCTGCACCCAGTTTTC-3'	
TNF α (human) forward	5'-CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG-3'	220 bp
TNF α (human) reverse	5'-GAGGACCTGGGAGTAGATGAG-3'	
18S (Maus) forward	5'-TTAAGAGGGACGGCCGGGGG-3'	354 bp
18S (Maus) reverse	5'-GCCGGGTGAGGTTTCCCGTG-3'	
Akt (Maus) forward	5'-CGCCGCTGATCAAGTTCTCT-3'	225 bp
Akt (Maus) reverse	5'-GACCTGGCTGGGAGGTAGGCT-3'	
IL1 β (Maus) forward	5'-AGCCTCGTGCTGTCGGACCC-3'	217 bp
IL1 β (Maus) reverse	5'-GCTTGGGATCCACACTCTCCAGC-3'	
IL6 (Maus) forward	5'-TAGTCCTTCTACCCCAATTTC-3'	76 bp
IL6 (Maus) reverse	5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'	
MCP1 (Maus) forward	5'-AGGTGTCCCAAAGAAGCTGTA-3'	161 bp
MCP1 (Maus) reverse	5'-ATGTCTGGACCCATTCTTCT-3'	
TNF α (Maus) forward	5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3'	102 bp
TNF α (Maus) reverse	5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'	

2.3.6. Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden mit der GraphPad Prism®-Software Version 5.02 durchgeführt. Die Daten wurden nach Kolmogorov-Smirnoff auf Normalverteilung getestet. Die statistische Signifikanz wurde bei nachgewiesener Normalverteilung mittels *Student's t-Test* oder einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgenden Bonferroni's Post Test ermittelt. Lag keine Normalverteilung vor, wurde die statistische Signifikanz mittels nicht-parametrischen Tests, das heißt Mann-Whitney U-Test oder Kruskal-Wallis Test mit Dunn's *Multiple Comparison Test* ermittelt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler *standard error of the mean* (SEM) angegeben. Ab einem p-Wert von $<0,05$ wurden Unterschiede als signifikant gewertet. Die Korrelation wurde mit der Pearson Methode errechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung des PI3K/Akt-Signalwegs bei MI/R

Untersuchungen an TLR2-defizienten Mäusen zeigten, dass diese im Vergleich zu Wildtyp-Tieren einen deutlichen Vorteil nach Myokardinfarkt und Reperfusion aufwiesen [83]. Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch bislang nur unzureichend bekannt.

Die Ergebnisse von Ha et al. und Arbibe et al. geben Hinweise darauf, dass durch die Stimulation von TLR2 der PI3K/Akt-Signalweg induziert wird [60, 90]. Im Folgenden sollte zum einen die Auswirkung der Inhibition von PI3K oder Akt auf die Schädigung des Myokards nach MI/R geklärt werden und zum anderen die myokardiale Proteinexpression von PI3K und Akt1 und deren Aktivierung untersucht werden.

3.1.1. Auswirkungen der Inhibition von Akt oder PI3K auf die Kardioprotektion bei TLR2-Defizienz

Die Mäuse wurden 1 Stunde vor OP intraperitoneal mit Vehikel (5% DMSO in PBS), Akt Inhibitor V (AIV) oder dem PI3K-Inhibitor Wortmannin (wort) vorbehandelt und einer 30-minütigen Ischämie und 4-stündigen Reperfusion unterzogen. Die Größe der „*area at risk*“/linker Ventrikel (AR/LV) wurde nach Färbung mit Evans Blue und die Infarktgröße/„*area at risk*“ (IS/AR) nach Färbung mit NBT planimetrisch bestimmt. Weiterhin wurde der Plasmaspiegel von Troponin T als systemischer Marker für die myokardiale Schädigung mit dem Cardiac Reader (Roche, Mannheim) gemessen [85].

Die Größe der AR/linkem Ventrikel (LV) war in allen 6 Gruppen vergleichbar (Abbildung 3.1 A). Wie in der Literatur beschrieben, zeigten Vehikel-behandelte TLR2^{-/-}-Mäuse signifikant kleinere Infarkte als WT-Tiere (Abbildung 3.1 B, C), was sich auch in den Troponin T-Werten widerspiegelte (Abbildung 3.1 D). Sowohl die Behandlung mit dem Akt-Inhibitor (Abbildung 3.1 B) als auch die Behandlung mit PI3K-Inhibitor Wortmannin führte zur Aufhebung der Infarktgrößenreduktion in den TLR2^{-/-}-Mäusen (Abbildung 3.1 C). Die bei den Vehikel-behandelten TLR2^{-/-}-Tieren beobachtete Reduktion von Troponin T wurde ebenfalls durch die Behandlung mit Wortmannin und AIV aufgehoben (Abbildung 3.1D).

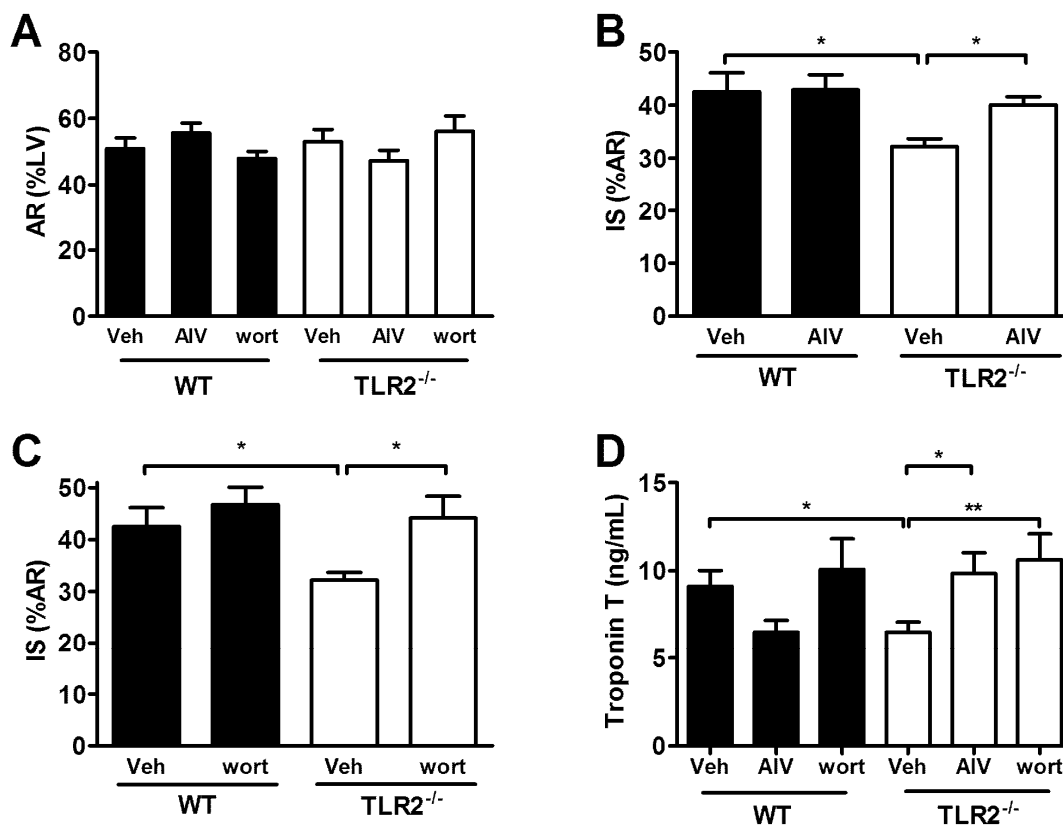


Abbildung 3.1: Effekt der Inhibition von PI3K bzw. Akt1 auf die myokardiale Schädigung nach MI/R
 (A) Die Größe der *area at risk*/linken Ventrikel (AR/%LV) nach 30min Ischämie und 4h Reperfusion nach Vorbehandlung mit Vehikel, Akt Inhibitor V (AIV) sowie Wortmannin (wort) bei TLR2-*knockout* (TLR2^{-/-})- und Wildtyp (WT)-Tieren. Infarktgrößenbestimmung (*infarct size* (IS)/%AR) nach 30min Ischämie/4h Reperfusion bei TLR2^{-/-}- und vergleichbaren WT-Tieren, die mit Vehikel und AIV (B) oder Vehikel und Wortmannin (C) vorbehandelt waren. (D) Troponin T- Spiegel nach 30min Ischämie/4h Reperfusion bei WT- und TLR2^{-/-}-Tieren +/- Inhibitor. Signifikanzen wurden mittels *student's t*-Test ermittelt. *p<0,05, **p<0,01. Die Daten sind als MW +/- SEM dargestellt (n=6/Gruppe).

3.1.2. Basale Akt1-Proteinexpression in TLR2^{-/-}- und WT- Herzen

Die Analyse der myokardialen Proteinexpression mittels Western Blot bei WT- und TLR2^{-/-}-Mäusen, die keiner MI/R-Operation unterzogen wurden, ergab eine signifikant erhöhte relative Proteinexpression von Akt1 im TLR2^{-/-}-Herz (Abbildung 3.2 A). Hingegen zeigte die Analyse der Proteinexpression von phosphorylierten Akt1 (pAkt1), sowie des Phosphorylierungsgrads von Akt1 (pAkt1/Akt1) keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und TLR2-*knockout* (Abbildung 3.2 B, C). Die Analyse der mRNA-Expression von Akt nach RT-qPCR ergab keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 3.2 D).

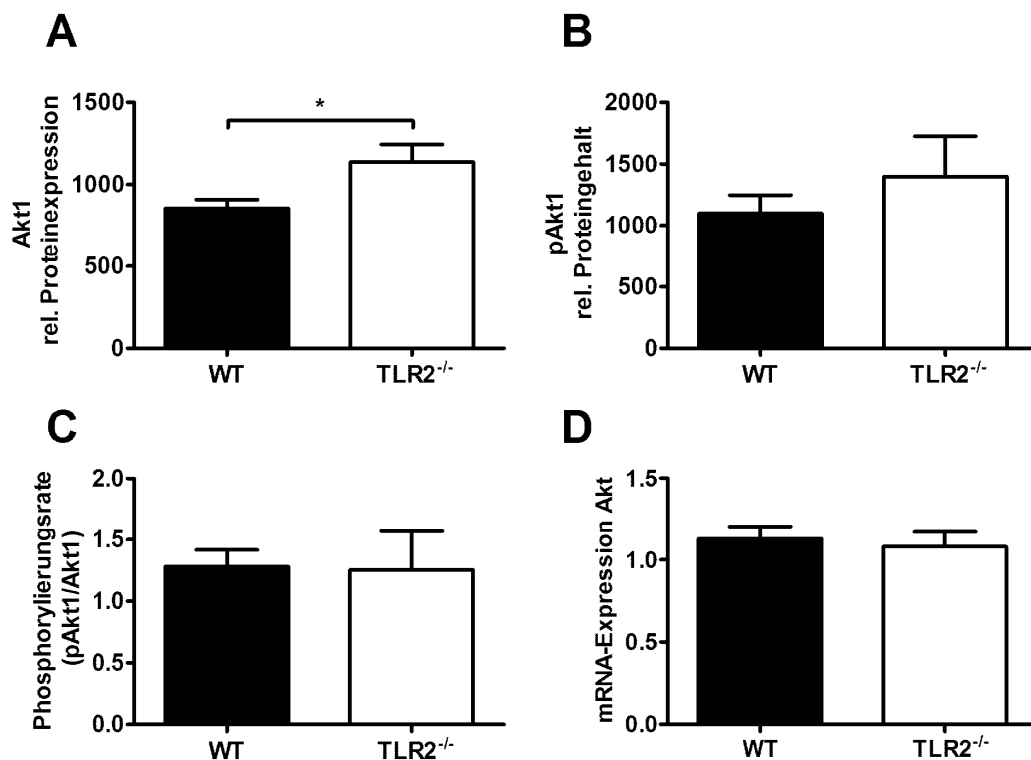


Abbildung 3.2: Protein- und mRNA-Expression von Akt1 in Herzen von *knockout* (TLR2^{-/-}) und Wildtyp (WT)-Mäusen

Densitometrische Auswertung der Proteinexpression von Akt1 (A) und des Proteingehalts von phosphoryliertem Akt1 (pAkt1) (B) nach Western Blot- Analyse von Wildtyp- (WT) und *knockout* (TLR2^{-/-})-Herzen ohne OP. (C) Phosphorylierungsgrad von Akt1 (pAkt1/Akt1). (D) mRNA-Expression von Akt. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM (n=5-6/Gruppe), Prüfung der statistischen Signifikanz mittels *student's t-Test*, $p < 0,05$.

3.1.3. Akt1-Proteinexpression in WT- und TLR2^{-/-}-Herzen nach MI/R

Um zu untersuchen inwieweit MI/R die Proteinexpression von Akt1 und PI3K beeinflusste, wurde diese in Herzen von *knockout*- und WT-Tieren nach MI/R mittels Western Blot analysiert. Die myokardiale Proteinexpression von Akt1 und der Proteingehalt an phosphoryliertem Akt1 im Infarktgebiet nach 30-minütiger Ischämie und 4-stündiger Reperfusion war in den Vehikel-behandelten TLR2^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren signifikant erhöht (Abbildung 3.3 A, B). Es konnte jedoch keine Änderung des Phosphorylierungsgrades in WT- und TLR2^{-/-}-Tieren detektiert werden (Abbildung 3.3 C). Die Vorbehandlung mit Akt-Inhibitor reduzierte die Expression von Akt1 und pAkt1 sowohl im WT als auch im TLR2-*knockout* (Abbildung 3.3 A, B).

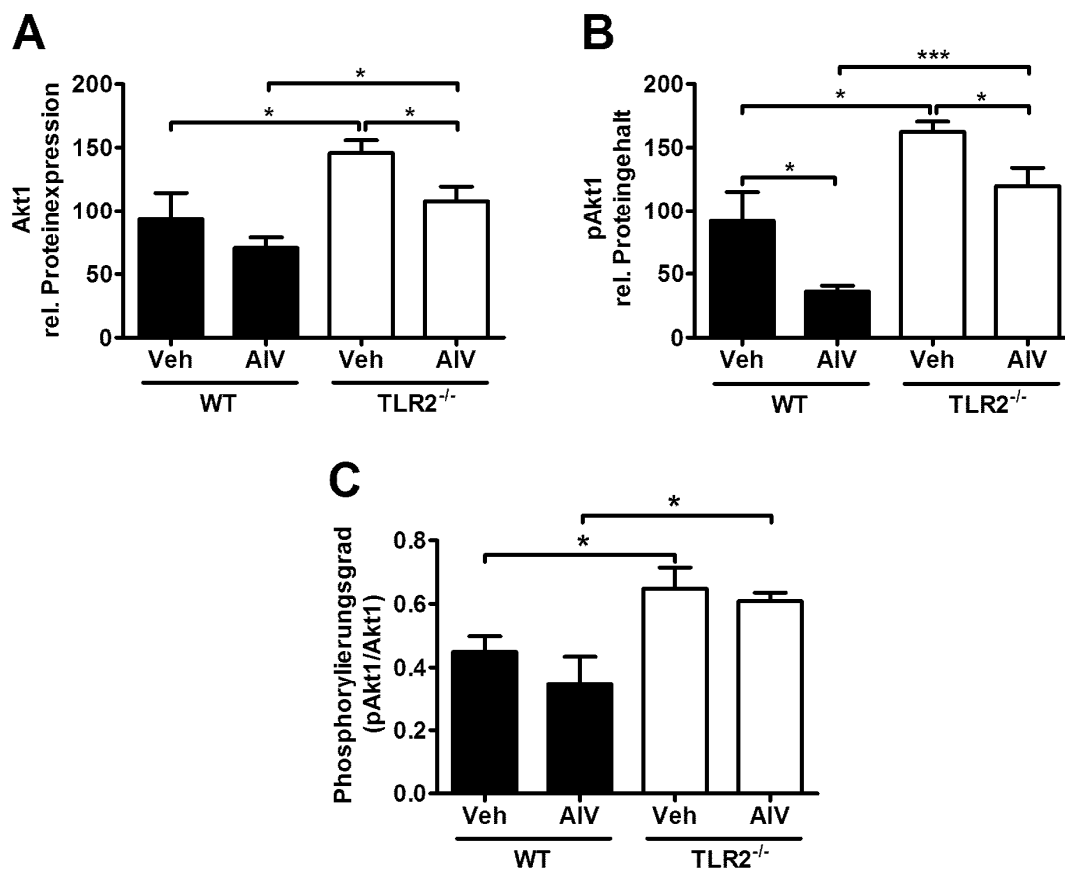


Abbildung 3.3: Relative Akt1-Proteinexpression und relativer Proteingehalt von phosphoryliertem Akt1 (pAkt1) im Wildtyp (WT)- und TLR2-defizienten (TLR2^{-/-})-Myokard nach MI/R

Relative Proteinexpression von Akt1 (A), pAkt1 (B) sowie der Phosphorylierungsgrad (C) nach densitometrischer Auswertung der Western Blots des Infarktgebietes von WT- und TLR2^{-/-}-Herzen nach 30min Ischämie und 4h Reperfusion nach Vorbehandlung mit Vehikel (Veh) (5% DMSO in PBS) oder Akt Inhibitor V (AIV). Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM (n=6/Gruppe), Prüfung der statistischen Signifikanz mittels *student's t*-Test. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die Proteinexpression von PI3K und pPI3K sowie der Phosphorylierungsgrad von PI3K wiesen in Vehikel-behandelten Tieren keine Unterschiede zwischen TLR2^{-/-}- und WT-Mäusen auf. Die Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor Wortmannin beeinflusste dieses Ergebnis nicht (Abbildung 3.4 A-C).

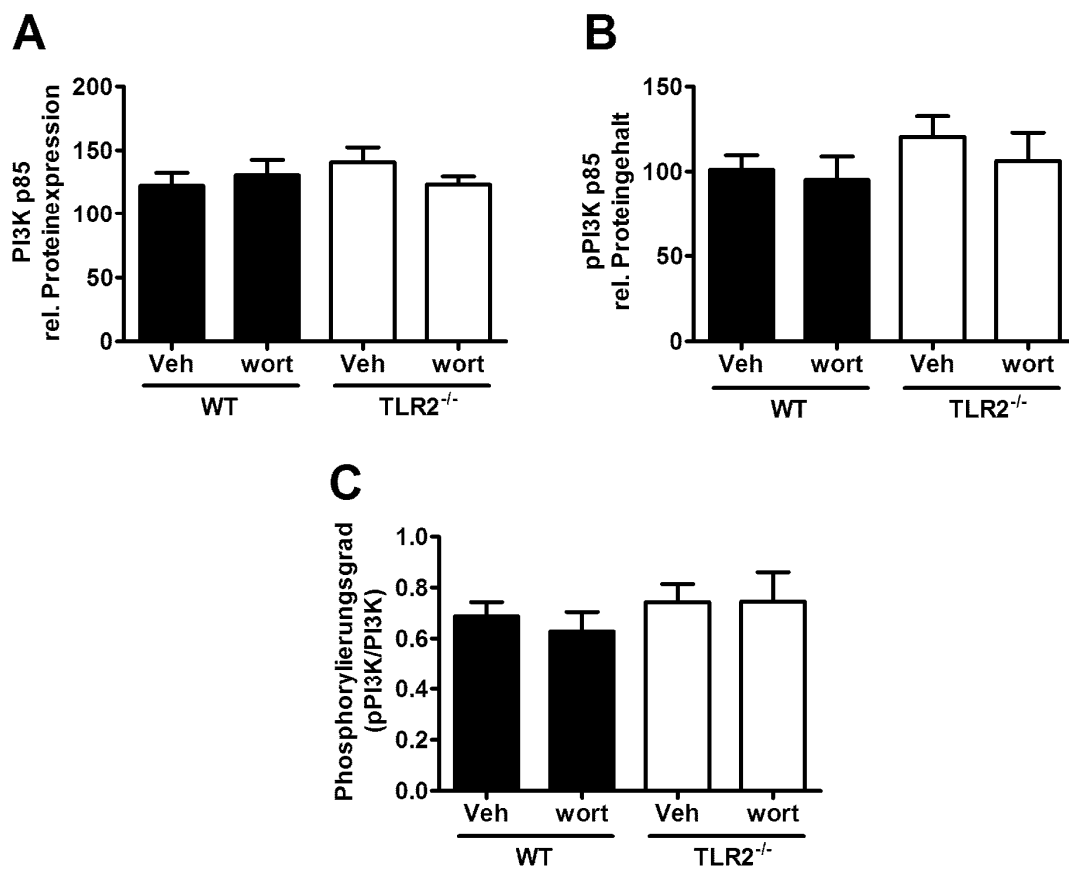


Abbildung 3.4: Proteinexpression von PI3K und phosphoryliertem PI3K (pPI3K) in Wildtyp (WT)- und TLR2-knockout (TLR2^{-/-})-Myokard nach MI/R

Myokardiale (A) PI3K- und (B) pPI3K- Proteinexpression im Infarktgebiet von WT- und TLR2^{-/-}-Mäusen nach Vorbehandlung mit Vehikel (Veh) (5% DMSO in PBS) oder Wortmannin (wort) und 30min Ischämie/4h Reperfusion. (C) Phosphorylierungsgrad von PI3K (pPI3K/PI3K). Die Daten sind als Mittelwert +/- SEM dargestellt (n=6).

Zusätzlich wurde die Akt1-Proteinexpression auch nach 30-minütiger Ischämie und 24-stündiger Reperfusion untersucht. Wie basal und nach 30-minütiger Ischämie und 4-stündiger Reperfusion ließ sich auch nach 24 Stunden Reperfusion eine erhöhte Akt1-Proteinexpression im TLR2-knockout-Myokard nachweisen (Abbildung 3.5 A, B).

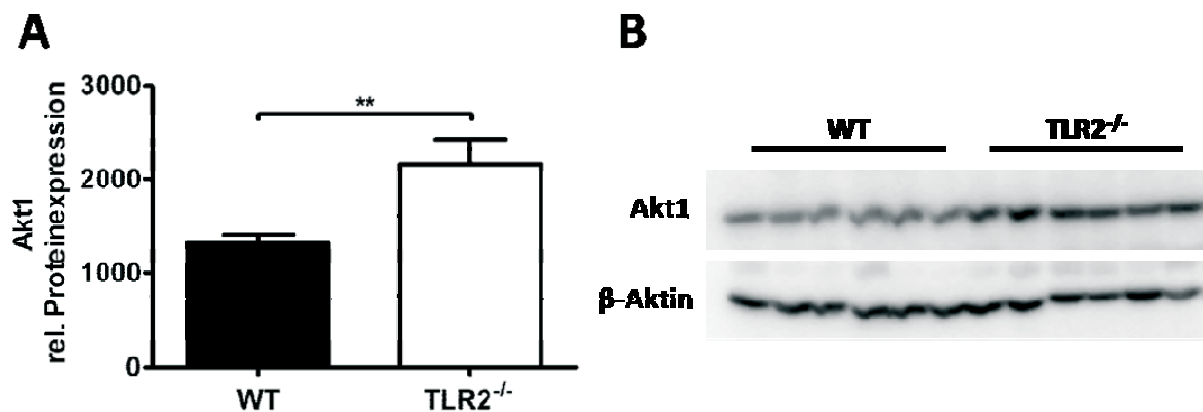


Abbildung 3.5: Akt1-Proteinexpression nach 30min Ischämie und 24h Reperfusion

(A) Densitometrische Auswertung der relativen Proteinexpression von Akt1 bei Wildtyp (WT) und TLR2-knockout (TLR2^{-/-}) (n=6/Gruppe). (B) Western Blot von Akt1 bei WT und TLR2^{-/-}. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet. Darstellung der Daten als Mittelwert +/- SEM. Signifikanz wurde mittels *student's t*-Test errechnet. **p<0,01.

Nachdem die TLR2^{-/-}-Tiere neben der bereits bekannten Reduktion der Infarktgröße eine deutlich höhere relative Proteinexpression für Akt1 zeigten, wurde der Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern untersucht.

Die Korrelation der Ergebnisse der relativen Expression von Akt1 und pAkt1 mit der Infarktgröße ergab bei beiden Gruppen (WT und TLR2^{-/-}) in den Vehikel-behandelten Kontrolltieren eine negative Korrelation zwischen diesen Parametern. So ließ sich zeigen, dass die Infarktgröße im jeweils untersuchten Tier umso größer waren, je geringer die nachgewiesene Proteinexpression von Akt1 oder der Proteingehalt an pAkt1 war (Abbildung 3.6 A, B). Dies galt auch für den Phosphorylierungsgrad von Akt1, der bei den Kontrolltieren ebenfalls mit der Infarktgröße korrelierte (Abbildung 3.6 C). Durch die Behandlung mit Akt Inhibitor V ließ sich die Korrelation für Akt1, pAkt1 und den Phosphorylierungsgrad von Akt1 mit der Infarktgröße bei beiden Gruppen aufheben (Abbildung 3.7 A-C).

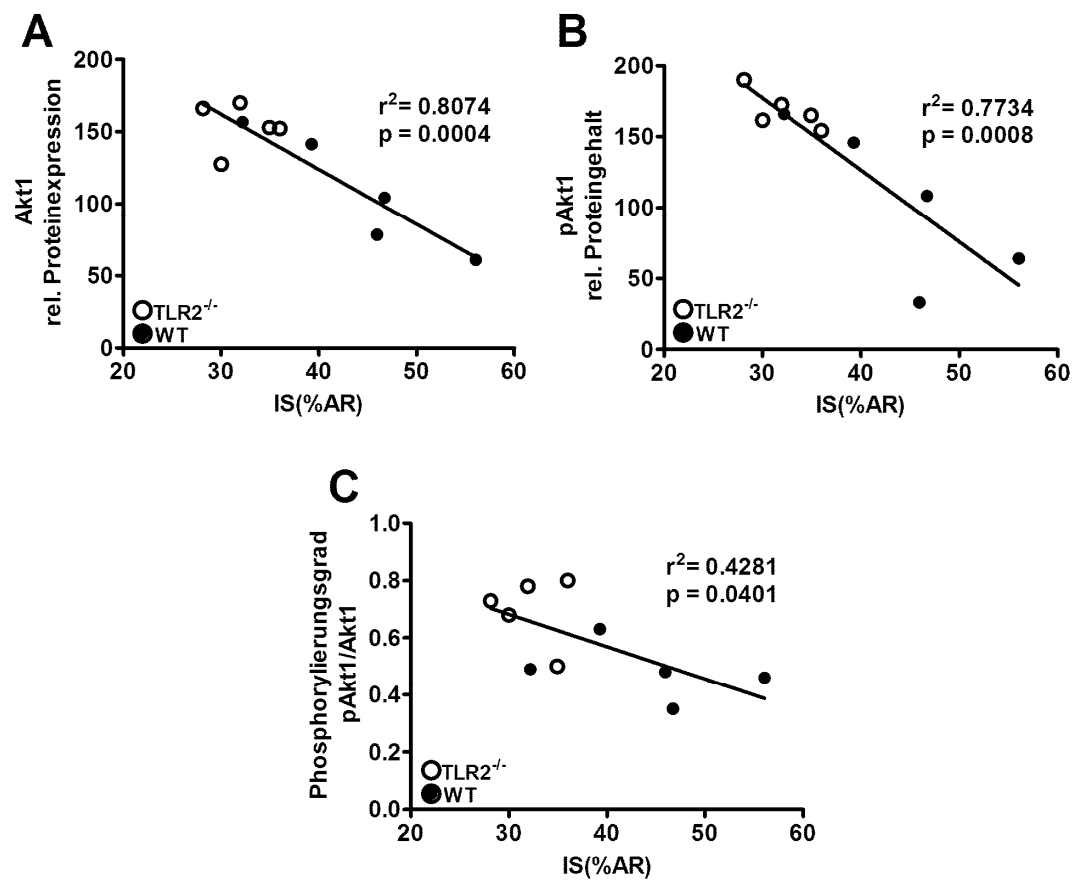


Abbildung 3.6: Korrelation der relativen Proteinexpression von Akt1 und dem relativen Proteingehalt an phosphoryliertem Akt1 (pAkt1) mit der Infarktgröße/area at risk (IS/(%AR))

Korrelation der relativen Proteinexpression von Akt1 (A), pAkt1 (B) sowie der Phosphorylierungsrate von Akt1 (pAkt1/Akt1) und der Infarktgröße nach 30min Ischämie und 4h Reperfusion in Vehikel-behandelten Wildtyp (WT)- und TLR2-knockout (TLR2^{-/-})-Tieren. r^2 - und p - Werte wurden nach der Pearson Methode berechnet.

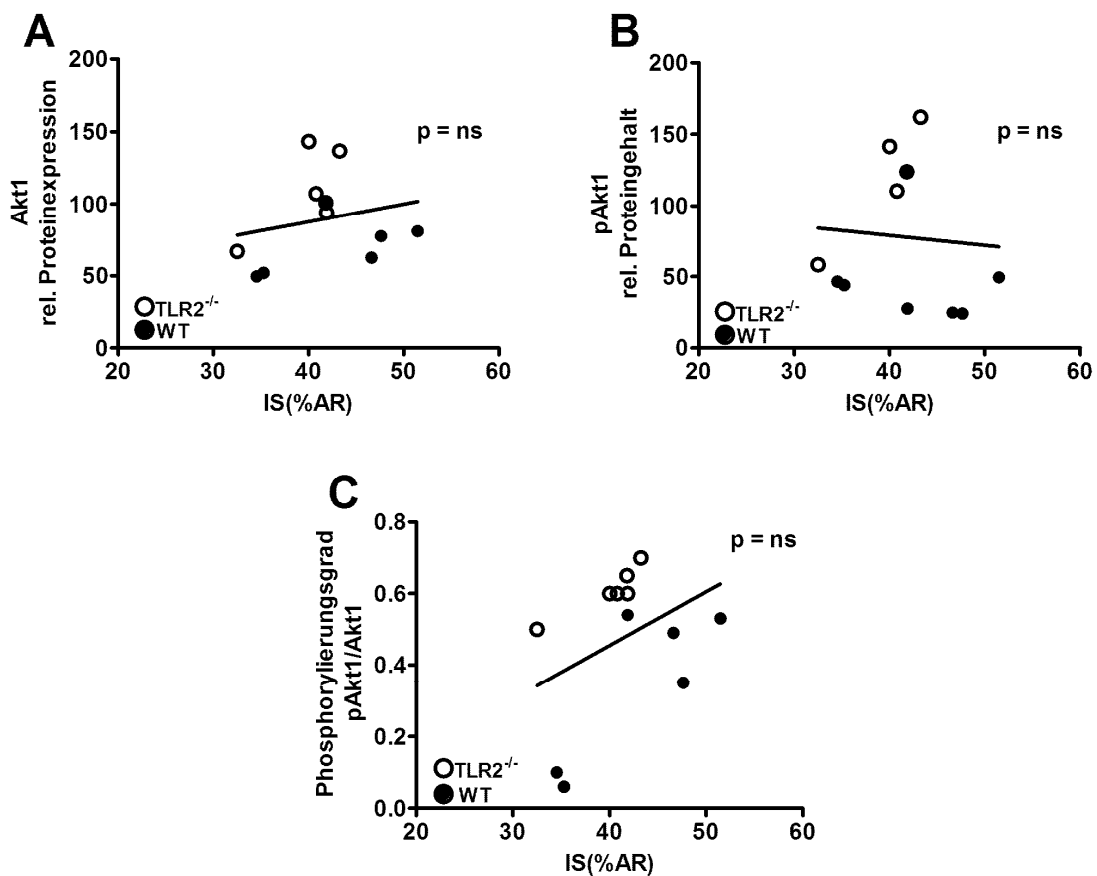


Abbildung 3.7: Korrelation der relativen Proteinexpression von Akt1 und dem relativen Proteingehalt an phosphoryliertem Akt1 (pAkt1) mit der Infarktgröße/area at risk (IS/(%AR))

Korrelation der relativen Proteinexpression von Akt1 (A), pAkt1 (B) sowie der Phosphorylierungsrate von Akt1 (pAkt1/Akt1) und der Infarktgröße nach 30min Ischämie und 4h Reperfusion in Wildtyp (WT)- und TLR2-*knockout* (TLR2^{-/-})-Tieren nach Vorbehandlung mit Akt Inhibitor V. p- Werte wurden nach der Pearson Methode berechnet.

3.2. Untersuchung der Rolle von Biglykan als TLR2-Ligand *in vitro*

Neben exogenen Liganden erkennt TLR2 auch endogene Liganden (Tabelle 1). Welche Liganden aber im Verlauf von MI/R an TLR2 binden, ist noch nicht bekannt. Ein Kandidat ist das SLRP Biglykan [35]. Im Folgenden sollte die Rolle von Biglykan als TLR2-Ligand bei MI/R untersucht werden.

3.2.1. Aktivierung von TLR2 durch Biglykan in HEK Blue™ Zellen

Nachdem Schäfer et al. eine NFκB-Antwort nach Bgn-Stimulation von TLR2-transfizierten HEK293 Zellen beschrieben haben, wurden zunächst HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des synthetischen TLR2-Liganden Pam₃Cys sowie Bgn in FCS-freiem Medium stimuliert [35]. Dadurch, dass bei diesen Zellen ein SEAP-Reporter gen an NFκB gekoppelt ist, wird bei Aktivierung von NFκB SEAP in den Überstand sezerniert. Die Menge der sezernierten SEAP kann mithilfe eines Detektionsmedium gemessen werden.

Um Unterschiede in der Reaktion des humanen und murinen TLR2 auszuschließen, wurden sowohl HEK Blue™ hTLR2- als auch HEK Blue™ mTLR2 Zellen stimuliert. Die beiden Zelllinien reagierten weitgehend identisch, wenn auch die HEK Blue™ mTLR2 Zellen geringere SEAP-Spiegel produzierten als die HEK Blue™ hTLR2 Zellen (Abbildung 3.8).

Bereits eine Konzentration von 0,01 µg/ml Pam₃Cys induzierte einen deutlichen Anstieg der OD und damit des SEAP-Spiegels. Bei Stimulation mit Bgn ließ sich erst bei 100 µg/ml eine deutliche Steigerung der SEAP-Sekretion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachweisen (Abbildung 3.8).

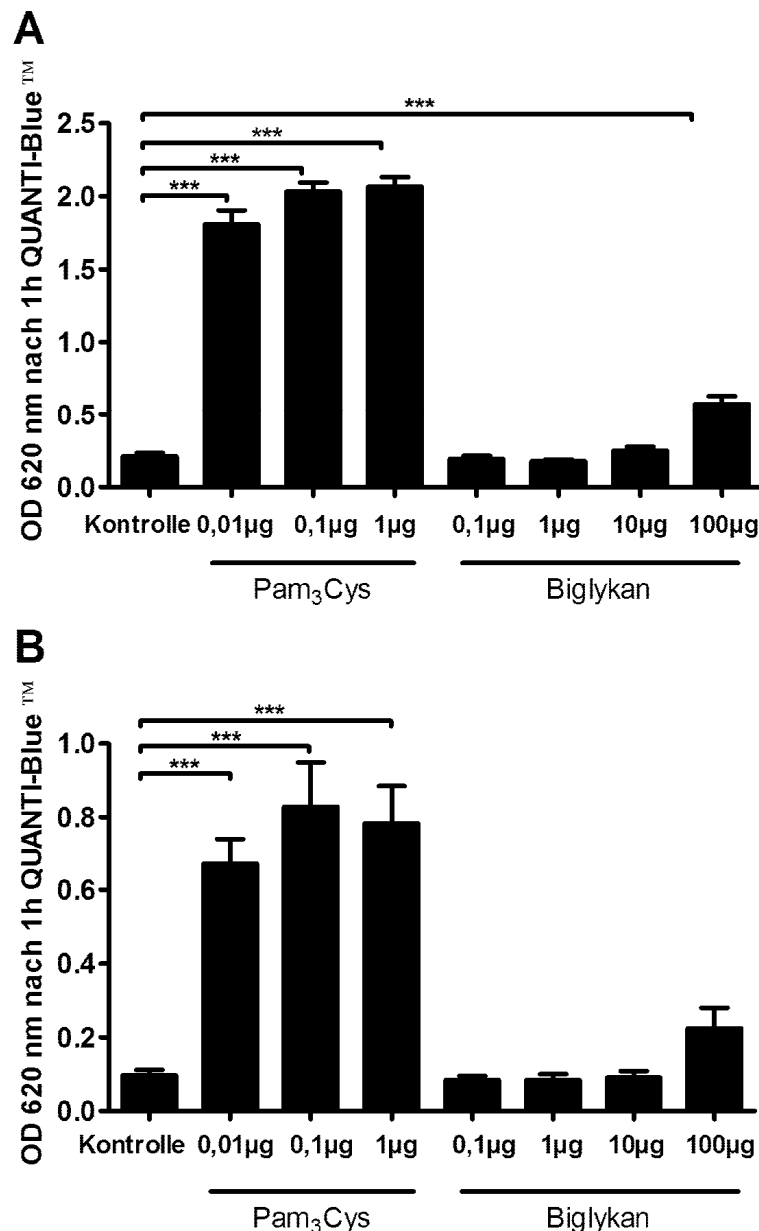


Abbildung 3.8: SEAP-Expression in HEK Blue™ hTLR2- und HEK Blue™ mTLR2 Zellen Stimulation mit Pam₃Cys und Biglykan

(A) Optische Dichte (OD) nach Inkubation des Überstands von HEK Blue™ hTLR2 Zellen nach Stimulation über 24h mit 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml Pam₃Cys und 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml Biglykan. Die Menge an SEAP im Zellüberstand wurde mittels QUANTI-Blue™-Detektionsmedium über die Messung der OD bei 620nm bestimmt. (B) OD nach Inkubation des Überstands von HEK Blue™ mTLR2 Zellen nach Stimulation über 24h mit 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml Pam₃Cys und 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml Biglykan mit QUANTI-Blue™ zur SEAP-Detektion. Daten dargestellt als Mittelwert +/- SEM. Signifikanz wurde mittels *student's t*-Test ermittelt, Markierung signifikanter Unterschiede: **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001. (n=3 in Triplikaten).

3.2.2. Aktivierung von TLR2 oder TLR4 durch Biglykan in THP1X Blue™ Zellen

Schäfer et al. beschrieben neben der Stimulation von TLR2 in HEK-Zellen auch die Stimulation von Makrophagen mit Bgn, wobei bei diesen Zellen sowohl TLR2 als auch TLR4 aktiviert werden [35]. Daher wurde neben der Antwort in den HEK Blue™ Zellen auch die Antwort von Monozyten nach Bgn-Stimulation überprüft. Mit THP1X Blue™ Zellen stand hierfür eine humane Monozytenzelllinie zur Verfügung, die im Gegensatz zu den HEK Blue™ neben TLR2 auch TLR4 exprimieren und wie diese Zellen bei Aktivierung von NFκB SEAP in den Zellüberstand sezernieren.

Die Stimulation mit Bgn ergab für die THP1X Blue™ Zellen bereits bei einer Stimulation mit 0,01 µg/ml Pam₃Cys im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine signifikant erhöhte SEAP-Sekretion. Die SEAP-Sekretion in den Bgn-stimulierten THP1X Blue™ Zellen entsprach der unstimulierten Kontrolle (Abbildung 3.9).

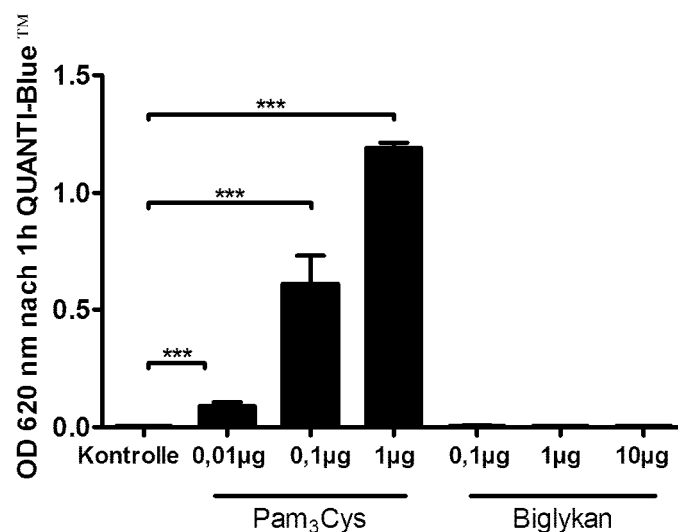


Abbildung 3.9: SEAP-Expression in THP1X Blue™ Zellen nach Stimulation mit Pam₃Cys und Biglykan
Optische Dichte (OD) nach 1h Inkubation des Überstands von THP1X Blue™ Zellen mit QUANTI-Blue™-Detektionsmedium nach Stimulation über 22h mit 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml Pam₃Cys und 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml Biglykan. Die Menge an SEAP im Zellüberstand wurde mittels QUANTI-Blue™-Detektionsmedium über die Messung OD bei 620nm bestimmt. Darstellung der Daten als Mittelwert +/- SEM (n=3 in Triplikaten bzw. Duplikaten). Signifikanzen wurden je nach Normalverteilung mittels *student's t-Test* oder Mann Whitney U-Test ermittelt (p<0,05). ***p<0,001.

3.2.3. Aktivierung von TLR2 oder TLR4 durch Biglykan-Stimulation in RAW264.7 Makrophagen

Da sämtliche Befunde von Schäfer et al. an murinen Makrophagen gezeigt wurden, wurden neben den humanen THP1X Blue™ Zellen auch eine murine Makrophagenzelllinie, die RAW264.7 Makrophagen, mit Bgn und Pam₃Cys stimuliert. Die RAW264.7 Makrophagen wurden vor der Stimulation für 24 Stunden in FCS-freiem Medium kultiviert und dann mit verschiedenen Konzentrationen Pam₃Cys und Bgn stimuliert. Nach 2-stündiger Stimulation mit Pam₃Cys und 4-stündiger Stimulation mit Bgn wurde die mRNA-Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine mittels RT-qPCR untersucht. Pam₃Cys-Stimulation induzierte dabei eine deutliche Zytokinantwort für MCP1, IL 6, IL 1 β und TNF α , während Bgn-Stimulation keine Zytokinantwort induzierte (Abbildung 3.10). Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die ohne zusätzliche Stimulation in FCS-freiem Medium kultiviert wurden.

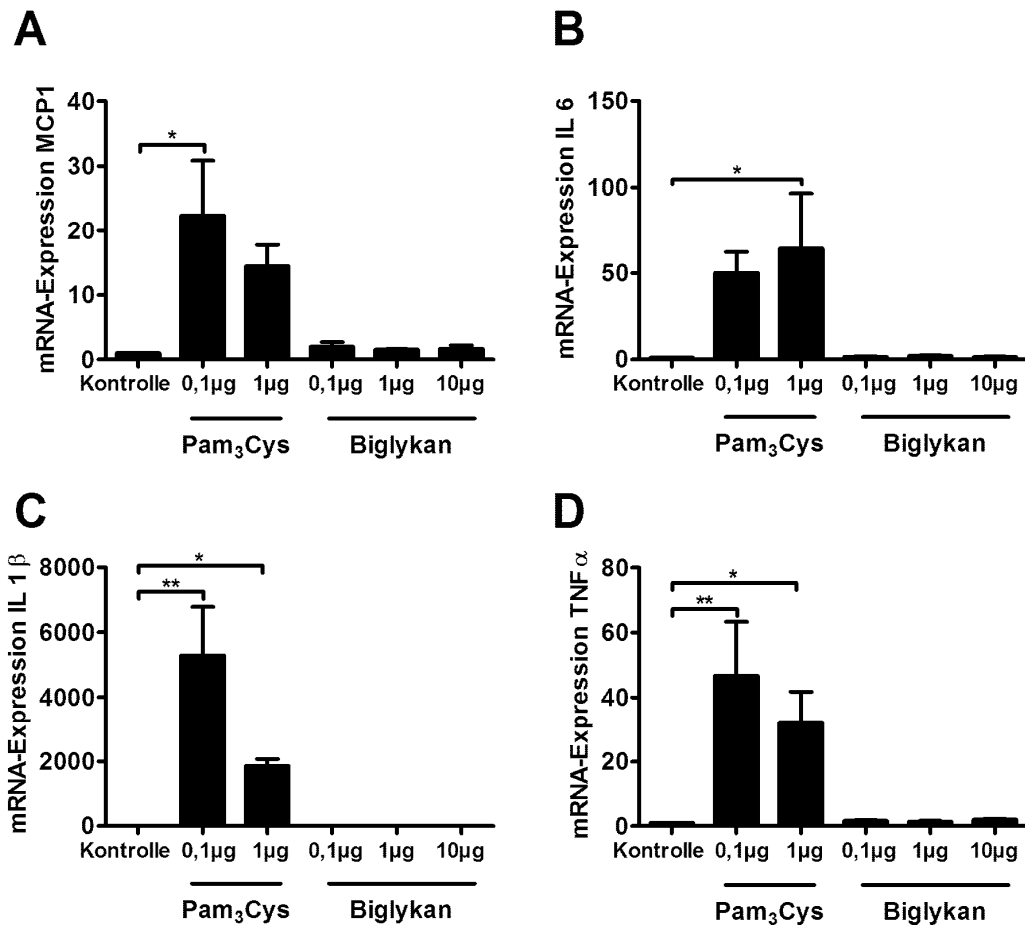


Abbildung 3.10: Zytokinantwort nach Stimulation von RAW264.7 Makrophagen mit Pam₃Cys und Biglykan

Expression von (A) MCP1-mRNA, (B) IL 6-mRNA, (C) IL 1β-mRNA und (D) TNFα-mRNA nach 2h Stimulation mit 0,1 μg/ml und 1 μg/ml Pam₃Cys sowie nach 4h Stimulation mit 0,1 μg/ml, 1 μg/ml und 10 μg/ml Biglykan (Bgn) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und Bonferroni's Post Test ermittelt ($p < 0,05$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM ($n=3$).

3.3. Untersuchung der Rolle von Biglykan bei MI/R *in vivo*

Um die Rolle von Bgn bei MI/R zu untersuchen, wurden WT- und Bgn^{-/-}-Mäuse einer 30-minütigen Ischämie und 24-stündigen Reperfusion unterzogen. Nach 24-stündiger Reperfusion wurde die Ligatur erneut geschlossen, das Herz mit Evans Blue perfundiert und in Scheiben geschnitten, um AR und ANR zu unterscheiden. Die AR relativ zum linken Ventrikel (AR/(%LV)) war zwischen den beiden Gruppen nicht verschieden (Abbildung 3.11 A). Die Infarktgröße (IS/(%AR)) wurde nach Färbung der mit NBT ermittelt. Der Vergleich der Infarktgröße bei WT- und Bgn^{-/-}-Tieren ergab keine Unterschiede (Abbildung 3.11 B), was sich auch in den Troponin T-Werten beider Gruppen widerspiegelte (Abbildung 3.11 C).

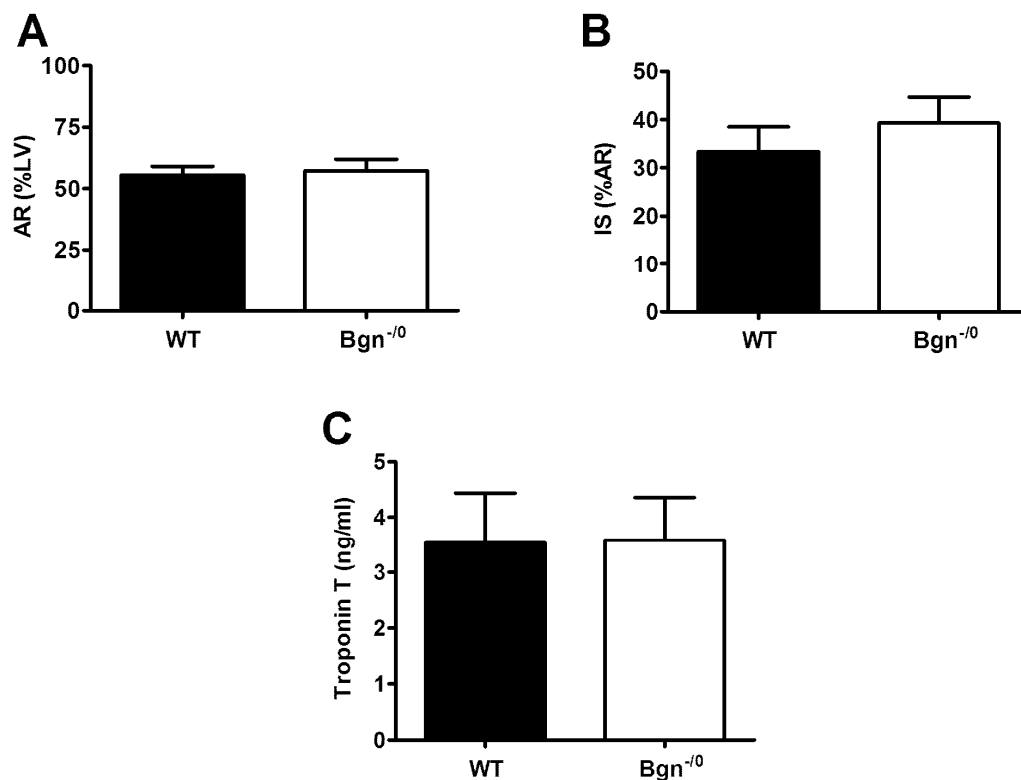


Abbildung 3.11: Infarktgröße und Troponin T in Wildtyp (WT)- und Biglykan-knockout (Bgn^{-/-})-Mäusen nach 24h Reperfusion

(A) Area at risk (AR)/%linker Ventrikel (LV) nach 30min Ischämie/24h Reperfusion bei WT und Bgn^{-/-}. (B) Prozentualer Anteil der Infarktgröße (IS) an der AR nach NBT-Färbung bei WT und Bgn^{-/-}. (C) Troponin T-Spiegel (ng/ml) in WT und Bgn^{-/-}. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM (n=6-7/Gruppe).

3.4. Untersuchung der Auswirkungen der Biglykan-Defizienz auf die TLR2-Proteinexpression

Neben dem Effekt der Bgn-Defizienz auf die Schädigung des Myokards nach MI/R wurde die relative myokardiale Proteinexpression von TLR2 mittels Western Blot-Analyse untersucht. Bei Herzen von Mäusen, die keiner Intervention unterzogen wurden, ließ sich kein Unterschied zwischen der TLR2-Expression im WT- und Bgn^{-/-}-Herz feststellen (Abbildung 3.12).

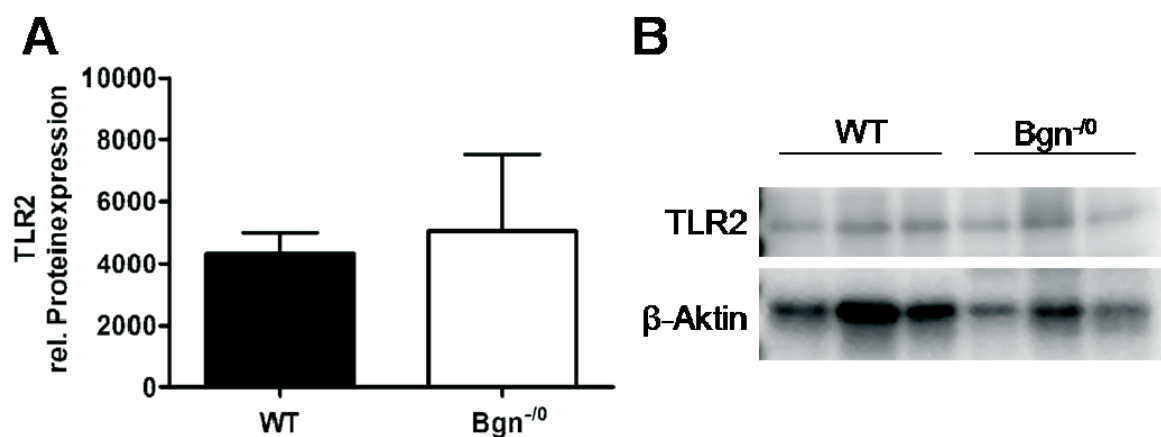


Abbildung 3.12: Relative Proteinexpression von TLR2 im *knockout* (Bgn^{-/-})- und Wildtyp (WT)-Myokard

(A) Densitometrische Auswertung der relativen Proteinexpression von TLR2 im WT- und Bgn^{-/-}-Myokard ohne OP. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM (n=3/Gruppe). (B) Western Blot zur Detektion der TLR2-Proteinexpression in WT- und Bgn^{-/-}-Myokard ohne OP. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

Nachdem in Herzen ohne Myokardinfarkt keine Unterschiede in der Proteinexpression von TLR2 zu detektieren waren, wurde diese im Myokard von WT- und Bgn^{-/-}-Mäusen nach 30-minütiger Ischämie und 2- oder 24-stündiger Reperfusion mittels Western Blot untersucht, um zu prüfen, ob MI/R eine Auswirkung auf die myokardiale TLR2-Proteinexpression hat. Dabei wiesen die Bgn^{-/-}-Herzen nach 2-stündiger Reperfusion im Vergleich zum WT sowohl in der AR als auch in der ANR eine signifikant ($p < 0,05$) reduzierte relative TLR2-Proteinexpression auf (Abbildung 3.13 A). Dieser Effekt war nach 24 Stunden Reperfusion nicht zu beobachten (Abbildung 3.13 C-F).

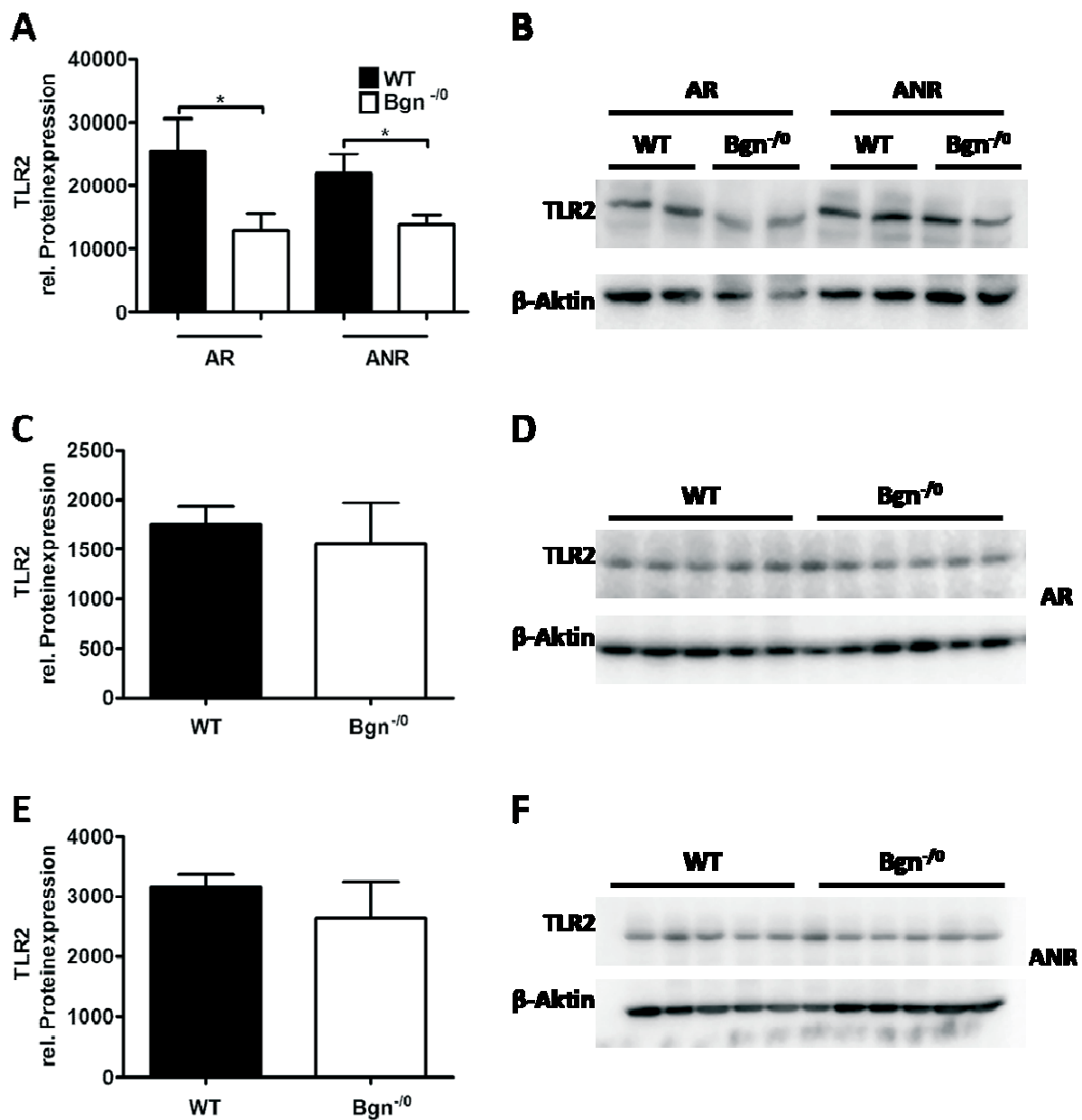


Abbildung 3.13: TLR2-Proteinexpression im Myokard nach 30min Ischämie und 2h oder 24h Reperfusion von Wildtyp (WT) und *knockout* (Bgn^{-/-})

(A) Densitometrische Auswertung der relativen Proteinexpression von TLR2 in *area at risk* (AR) und *area not at risk* (ANR) nach 30min Ischämie und 2h Reperfusion bei WT und Bgn^{-/-} (n=6-8/Gruppe). (B) Repräsentativer Western Blot für TLR2 nach 30min Ischämie und 2h Reperfusion. β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Densitometrische Auswertung der relativen Proteinexpression von TLR2 nach 30min Ischämie/24h Reperfusion in der AR (C) und ANR (E) von WT- und Bgn^{-/-}-Mäusen. Western Blot des Proteinlysats der AR (D) und ANR (F) von WT- und Bgn^{-/-}-Mäusen nach 30min Ischämie und 24h Reperfusion für TLR2. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM (n=4-5/Gruppe). Signifikanzen wurden je nach Normalverteilung der Daten mit *student's* t-Test oder Mann-Whitney U-Test errechnet. *p<0,05.

3.5. Untersuchung der Auswirkungen der Biglykan-Defizienz auf die Akt1-Proteinexpression

Nachdem bei TLR2-defizienten Mäusen eine deutlich erhöhte relative Akt1-Proteinexpression sowohl ohne OP (Abbildung 3.2 A) als auch in der AR nach 24-stündiger Reperfusion (Abbildung 3.5) nachgewiesen werden konnte, sollte auch das Proteinlysate der AR von WT- und Bgn-defizienten Mäusen nach 24 Stunden Reperfusion im Western Blot auf die Expression von Akt1 untersucht werden.

Der Vergleich der relativen Akt1-Proteinexpression in WT- und Bgn-*knockout*-Tieren zeigte keine signifikant unterschiedliche relative Akt1-Proteinexpression (Abbildung 3.14 A, B). Es ließ sich auch kein Unterschied im Proteingehalt an phosphorylierten Akt1 nachweisen (Abbildung 3.14 C, D).

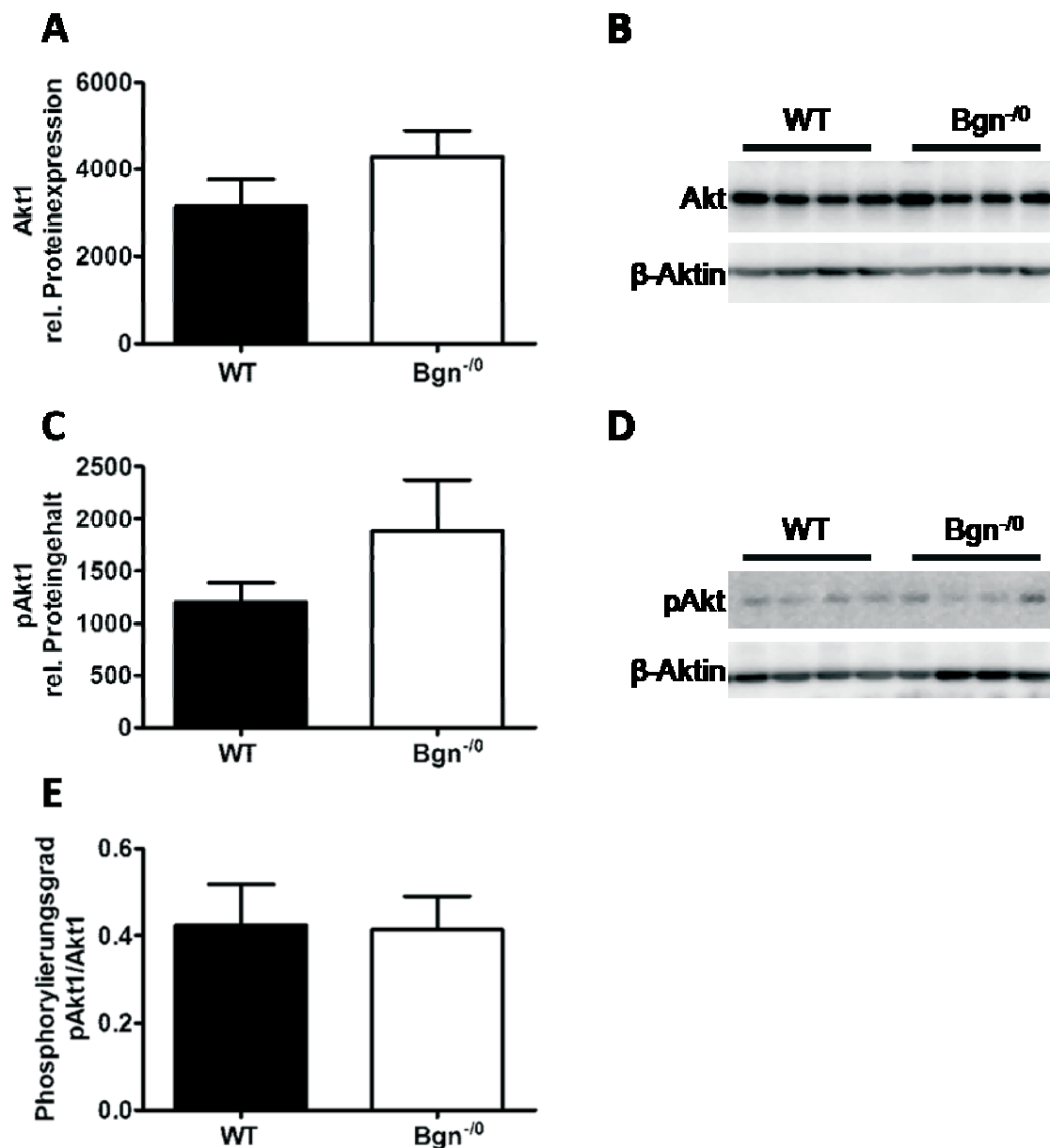


Abbildung 3.14: Vergleich der relativen Proteinexpression von Akt1 und phosphorylierten Akt1 (pAkt1) im Wildtyp (WT)- und Biglykan-knockout (Bgn^{-/-})-Myokard nach 30min Ischämie und 24h Reperfusion

(A) Densitometrische Auswertung der Akt1-Proteinexpression und (C) pAkt1-Proteingehalt bei WT und Bgn^{-/-} nach 30min Ischämie/24h Reperfusion. Western Blot des Proteinlysats der AR nach 30min Ischämie/24h Reperfusion von WT und Bgn^{-/-} für Akt1 (B) und pAkt1 (D). Als Ladekontrolle wurde jeweils β-Aktin verwendet. (E) Phosphorylierungsrate von Akt1 als Quotient der relativen Proteinexpression von pAkt1 und Akt1. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM (n=4-5/Gruppe).

3.6. Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit Mausplasma

TLR2-Defizienz hat einen protektiven Effekt nach MI/R [83]. Dies bedeutet zwangsläufig, dass es infolge MI/R zu einer Aktivierung von TLR2 kommt. Wodurch TLR2 dabei aktiviert wird, ist jedoch bislang nicht bekannt. Daher sollte im Folgenden das Plasma operierter Mäuse mittels Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen auf möglicherweise während MI/R freigesetzte TLR2-Liganden untersucht werden. Als Kontrolle wurden dabei unbehandelte Zellen verwendet, welche ohne FCS kultiviert wurden.

3.6.1. Auswirkungen der Stimulation mit Mausplasma auf die SEAP-Sekretion in HEK Blue™ hTLR2 und –mTLR2 Zellen

Zunächst wurde mittels Pam₃Cys-Stimulation die optimale Stimulationsdauer für eine aussagekräftige SEAP-Expression ermittelt. Hierzu wurden HEK Blue™ hTLR2 Zellen für 4, 6, 8 und 24 Stunden mit je 100ng/ml Pam₃Cys stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden 20µl des Überstands mit QUANTI-Blue™-Detektionsmedium bei 37°C inkubiert. Die im Überstand enthaltene SEAP bewirkte einen Farbumschlag im Detektionsmedium, dessen Intensität durch die Bestimmung der OD bei 620nm nach einer Stunde Inkubationszeit gemessen werden konnte. Bereits nach 4-stündiger Stimulation ließ sich eine signifikant höhere SEAP-Sekretion nach Pam₃Cys-Stimulation nachweisen, die sich im Verlauf der Stimulationsdauer bis 24 Stunden steigern ließ.

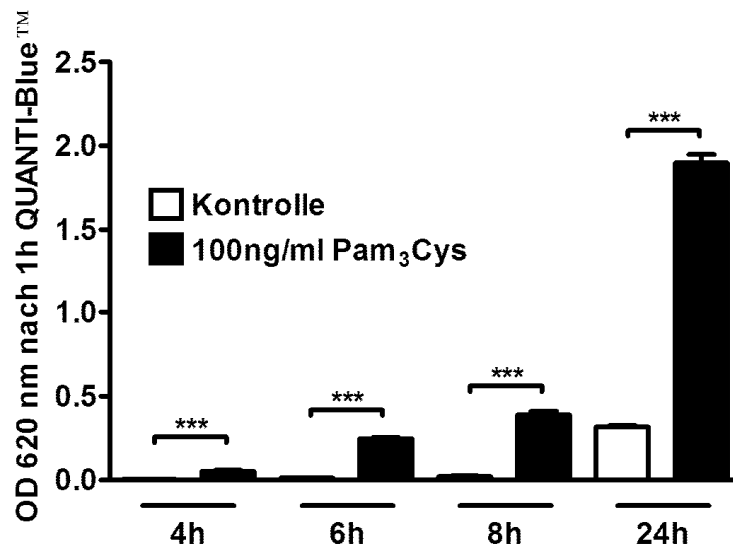


Abbildung 3.15: NFκB-vermittelte SEAP-Sekretion nach Pam₃Cys-Stimulation im Zeitverlauf

Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit 100 ng/ml Pam₃Cys in serumfreiem Medium für 4, 6, 8 und 24h. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet, die in serumfreien Medium kultiviert wurden. Die Menge an SEAP im Zellüberstand wurde mittels QUANTI-Blue™-Detektionsmedium über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 620nm bestimmt. Darstellung der Daten als Mittelwert +/- SEM (n=2 in Triplikaten). Signifikanzen wurde mittels *student's t-Test* ermittelt. ***p<0,001.

Nachdem die 24-stündige Stimulation mit Pam₃Cys eine deutliche SEAP-Sekretion induzierte, wurde diese Stimulationsdauer auch für die Stimulation mit Mausplasma verwendet.

Die HEK Blue™ hTLR2 Zellen wurden für 24 Stunden mit 100 ng/ml Pam₃Cys oder 10% Mausplasma im FCS-freiem Zellkulturmedium stimuliert. Dabei wurde zur Stimulation Plasma von Mäusen ohne OP, mit *sham*-OP oder mit 30min Ischämie und 2min, 15min, 30min, 2h, 10h und 24h Reperfusion verwendet. Bei den *sham*-operierten Mäusen wurde der Thorax eröffnet und die Mäuse nach einer Stunde terminiert.

Nach 24 Stunden Stimulation war eine deutliche Induktion der SEAP-Sekretion bei den Zellen mit Pam₃Cys-Stimulation nachweisbar. Bei den Zellen, die mit Plasma von unoperierten und MI/R-operierten Mäusen stimuliert wurden, war keine erhöhte SEAP-Menge im Überstand nachweisbar (Abbildung 3.16).

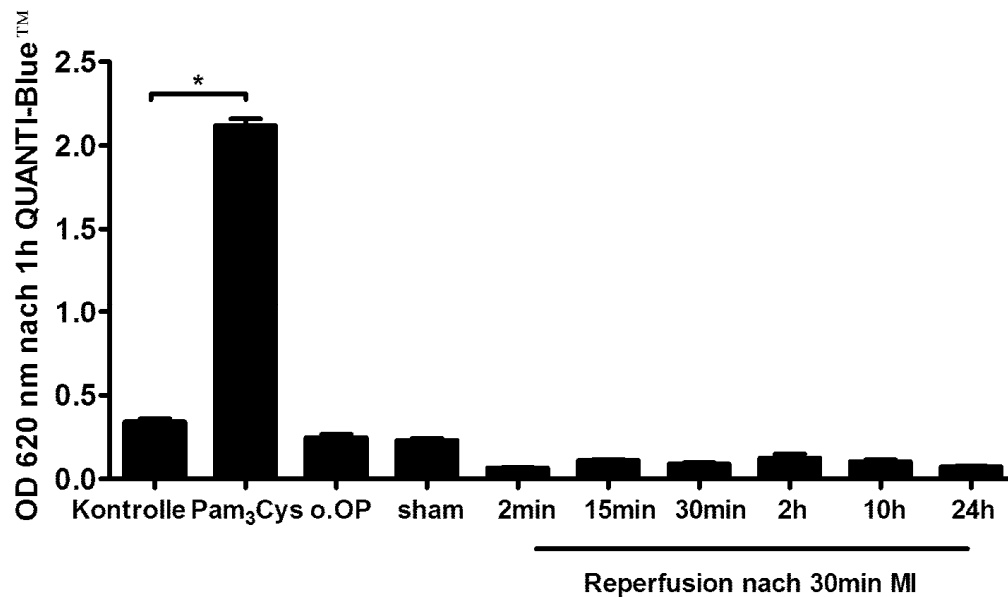


Abbildung 3.16: SEAP-Sekretion nach Plasmastimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen

Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit 100 ng/ml Pam₃Cys oder 10% Plasma von Mäusen ohne OP, *sham*-OP, sowie nach 2, 15, 30min und 2, 10 und 24h Reperfusion in serumfreien Zellkulturmedium. Die Menge an SEAP im Zellüberstand wurde mittels QUANTI-Blue™-Detektionsmedium über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 620nm bestimmt. Darstellung der Daten als Mittelwert +/- SEM (n=2-6 in Duplikaten). Statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney U- Test ermittelt. *p<0,05

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die nicht vorhandene SEAP-Sekretion nach Stimulation der HEK Blue™ hTLR2 Zellen auf den Speziesunterschied zwischen dem Plasma aus der Maus und dem humanen TLR2-Rezeptor, mit dem die HEK Blue™ hTLR2 Zellen transfiziert waren zurückzuführen war, wurde die gleiche Stimulation bei HEK Blue™ mTLR2 Zellen, die mit dem murinen TLR2-Rezeptor transfiziert waren, durchgeführt.

Auch bei den HEK Blue™ mTLR2 Zellen induzierte die Stimulation mit 100 ng/ml Pam₃Cys im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikant erhöhte SEAP-Sekretion. Die Behandlung der Zellen mit Plasma von unoperierten, *sham*-operierten oder MI/R-operierten Mäusen führte zu keiner erhöhten SEAP-Sekretion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3.17).

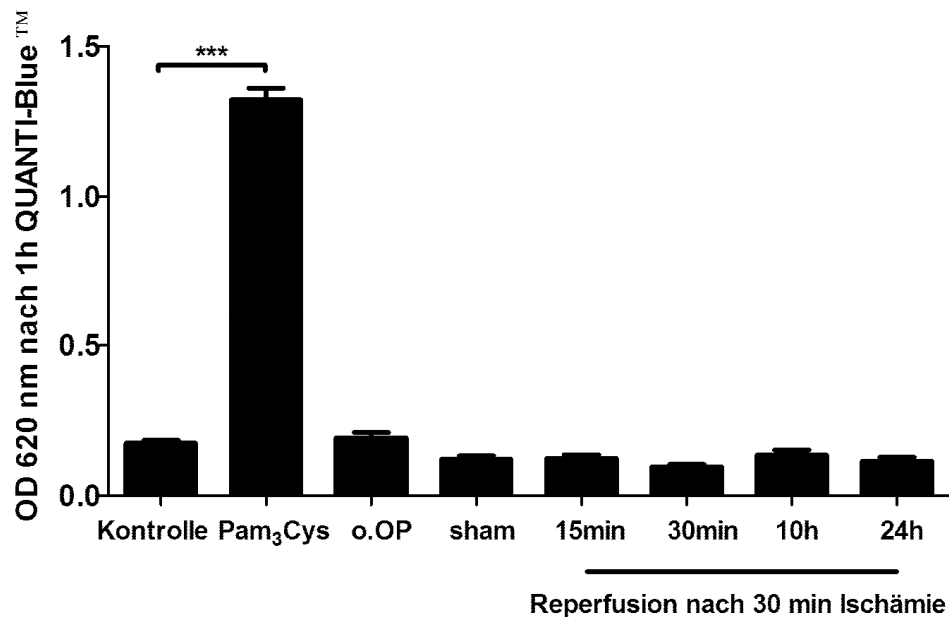


Abbildung 3.17: SEAP-Sekretion nach Plasmastimulation von HEK Blue™ mTLR2 Zellen

HEK Blue™ mTLR2 Zellen wurden für 24h mit 100 ng/ml Pam₃Cys oder je 10% Plasma von Mäusen ohne OP, *sham*-OP oder MI/R-OP (30min myokardiale Ischämie (MI) und 15min, 30min, 10h und 24h Reperfusion) in serumfreiem Zellkulturmedium stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die für 24h in FCS-freiem Zellkulturmedium kultiviert wurden. Die Menge an SEAP im Zellüberstand wurde mittels QUANTI-Blue™-Detektionsmedium über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 620nm bestimmt. Darstellung der Daten als Mittelwert +/- SEM (n=3-4 in Duplikaten). Signifikanz wurde mittels student's t-Test ermittelt. ***p<0,001.

3.6.2. Aktivierung von NFκB nach Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit Mausplasma

Neben der SEAP-Induktion sollte die Aktivierung von NFκB mittels Western Blot untersucht werden, um auszuschließen, dass die fehlende SEAP-Induktion nach Stimulation mit Mausplasma auf mangelnde Sensitivität der Methode zurückzuführen ist. Als Parameter für die Aktivierung von NFκB wurde die relative Proteinexpression von IκBα und phosphoryliertem IκBα gewählt. Wie bereits erwähnt kommt es erst zu einer Aktivierung von NFκB, wenn IκBα phosphoryliert und danach degradiert wird [30]. Um die optimale Stimulationsdauer für die Plasmastimulation zu ermitteln, bei der sowohl die Phosphorylierung als auch der Abbau von IκBα im Western Blot nachweisbar ist, wurden HEK Blue™ hTLR2 Zellen für 5, 10, 15 und 30 Minuten sowie 1, 2 und 4 Stunden mit Pam₃Cys

stimuliert. Vor der Stimulation wurden die Zellen für 24 Stunden in FCS-freiem Zellkulturmedium kultiviert. Sowohl Phosphorylierung als auch Abbau von I κ B α ließen sich nach 2- und 4-stündiger Stimulation nachweisen (Abbildung 3.18). Als unbehandelte Kontrolle wurde in den folgenden Experimenten das Proteinlysate von Zellen, die in FCS-freiem Medium kultiviert wurden, verwendet.

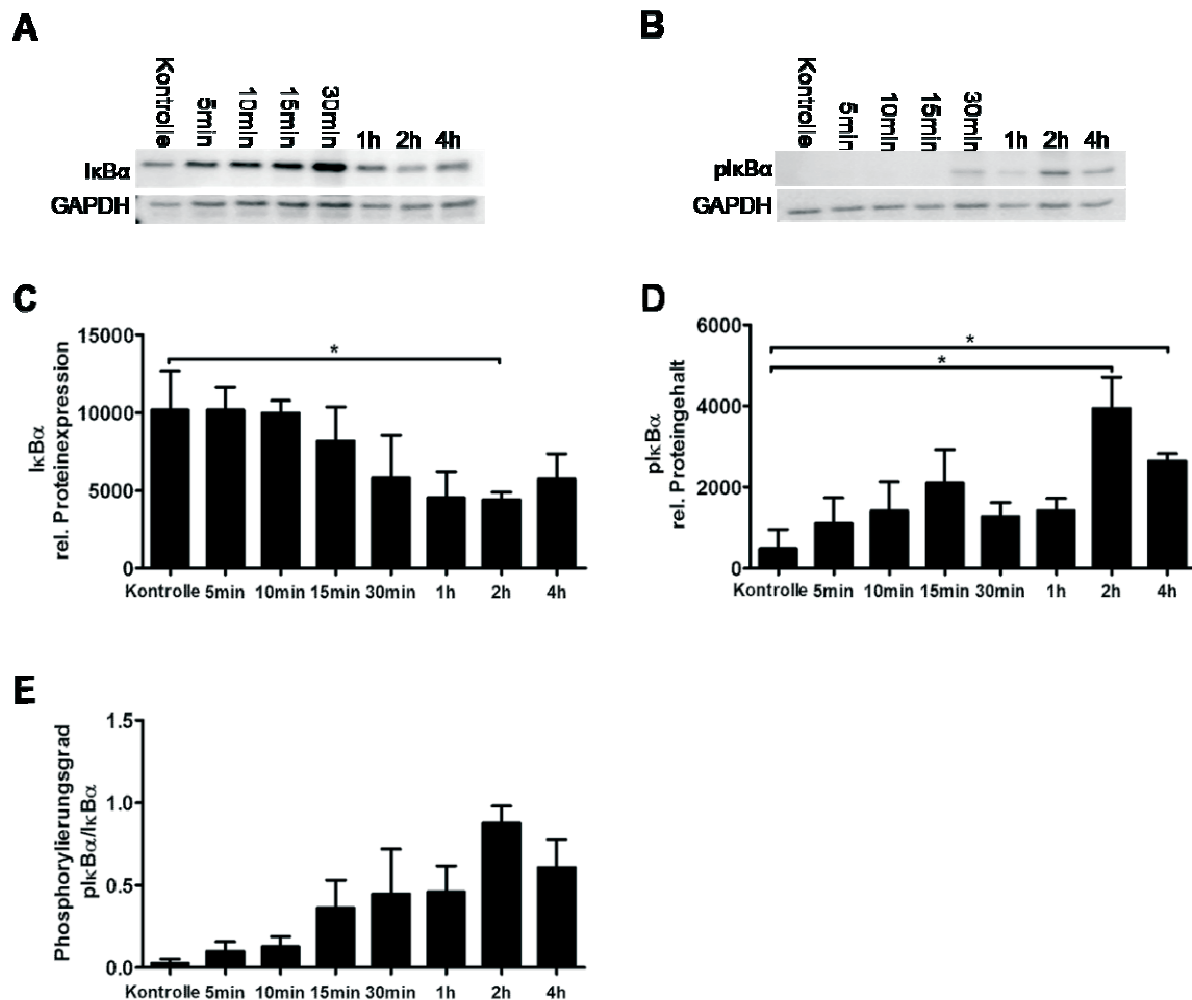


Abbildung 3.18: Western Blot-Analyse von I κ B α und I κ B α -Phosphorylierung in HEK Blue™ hTLR2 Zellen nach Stimulation mit Pam₃Cys

Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen für 5, 10, 15, 30min und 1, 2 und 4h mit je 100 ng/ml Pam₃Cys in Zellkulturmedium ohne fetales Kälberserum (FCS). Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die ohne zusätzliche Stimulation für 4h in FCS-freiem Zellkulturmedium kultiviert wurden. Repräsentativer Western Blot des Zelllysats nach Stimulation mit Pam₃Cys für I κ B α (A) bzw. pI κ B α (B) Densitometrische Auswertung der relativen Proteinexpression von I κ B α (C) und phosphorylierten I κ B α (pI κ B α) (D). (E) Phosphorylierungsgrad von I κ B α (pI κ B α /I κ B α). Als Ladekontrolle wurde GAPDH aufgetragen.

Darstellung der Daten (A-C) als Mittelwert \pm SEM (n=4). Ermittlung der Signifikanz mittels Mann-Whitney U-Test. *p<0,05.

Um sicherzustellen, dass die Veränderung in der Proteinexpression nach Pam₃Cys-Stimulation eine TLR2-spezifische Antwort darstellt und als Messsystem für die Aktivierung von TLR2 geeignet ist, wurden HEK Blue™ Null Zellen stimuliert. Diese Zellen exprimieren kein TLR2. Die Untersuchung der Phosphorylierung von IκBα in den HEK Blue™ Null Zellen ergab anders als in den HEK Blue™ hTLR2 Zellen keine signifikante Phosphorylierung von IκBα, die sich auch im Zeitverlauf der Stimulation nicht steigern ließ. Ein Abbau von IκBα war nicht nachzuweisen (Abbildung 3.19).

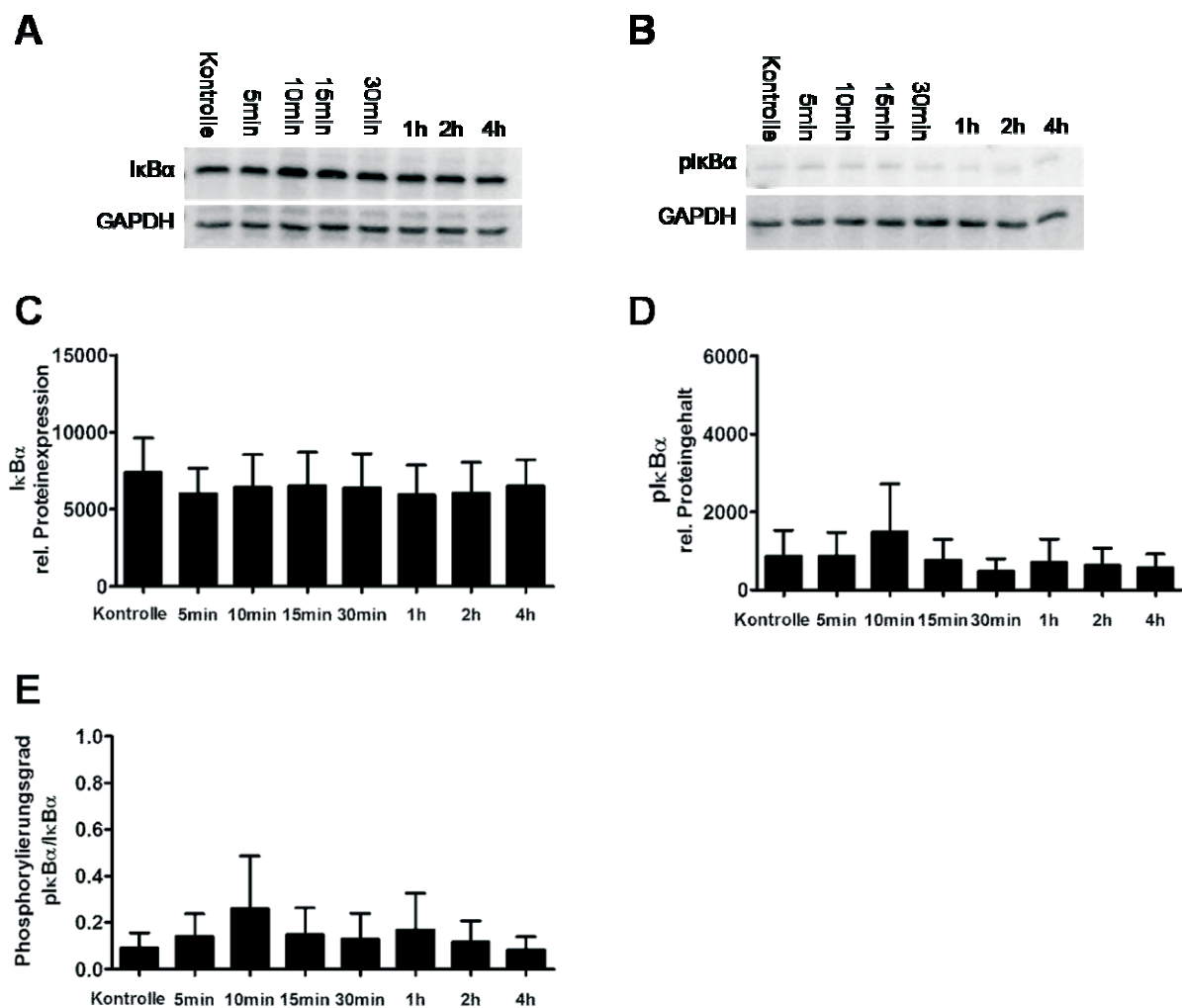


Abbildung 3.19: Western Blot-Analyse von IκBα und IκBα-Phosphorylierung in HEK Blue™ Null Zellen nach Stimulation mit Pam₃Cys

Stimulation von HEK Blue™ Null Zellen für 5, 10, 15, 30min und 1, 2 und 4h mit je 100 ng/ml Pam₃Cys in Zellkulturmedium ohne fetales Kälberserum (FCS). Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die ohne zusätzliche Stimulation für 4h in FCS-freiem Zellkulturmedium kultiviert wurden.

(A) Repräsentativer Western Blot des Zelllysats nach Stimulation mit Pam₃Cys für IκBα bzw. pIκBα (B). Densitometrische Auswertung der relativen Proteinexpression von IκBα (C) und phosphorylierten IκBα (pIκBα) (D). (E) Phosphorylierungsgrad von IκBα (pIκBα/IκBα). Als Ladekontrolle wurde GAPDH aufgetragen. Darstellung der Daten (A-C) als Mittelwert \pm SEM (n=4).

Nach der Stimulation mit Pam₃Cys wurde eine Stimulationsdauer von 4 Stunden für die Stimulation der Zellen mit dem Plasma operierter Tiere gewählt.

Zunächst wurden HEK Blue™ hTLR2 und -Null Zellen mit Pam₃Cys, sowie 10% Plasma von unoperierten Mäusen und Mäusen nach 30 Minuten Ischämie und 15 beziehungsweise 30 Minuten Reperfusion in FCS-freiem Medium stimuliert. Abbau und Phosphorylierung von

I κ B α waren nur nach Pam₃Cys-Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen nachweisbar (Abbildung 3.20).

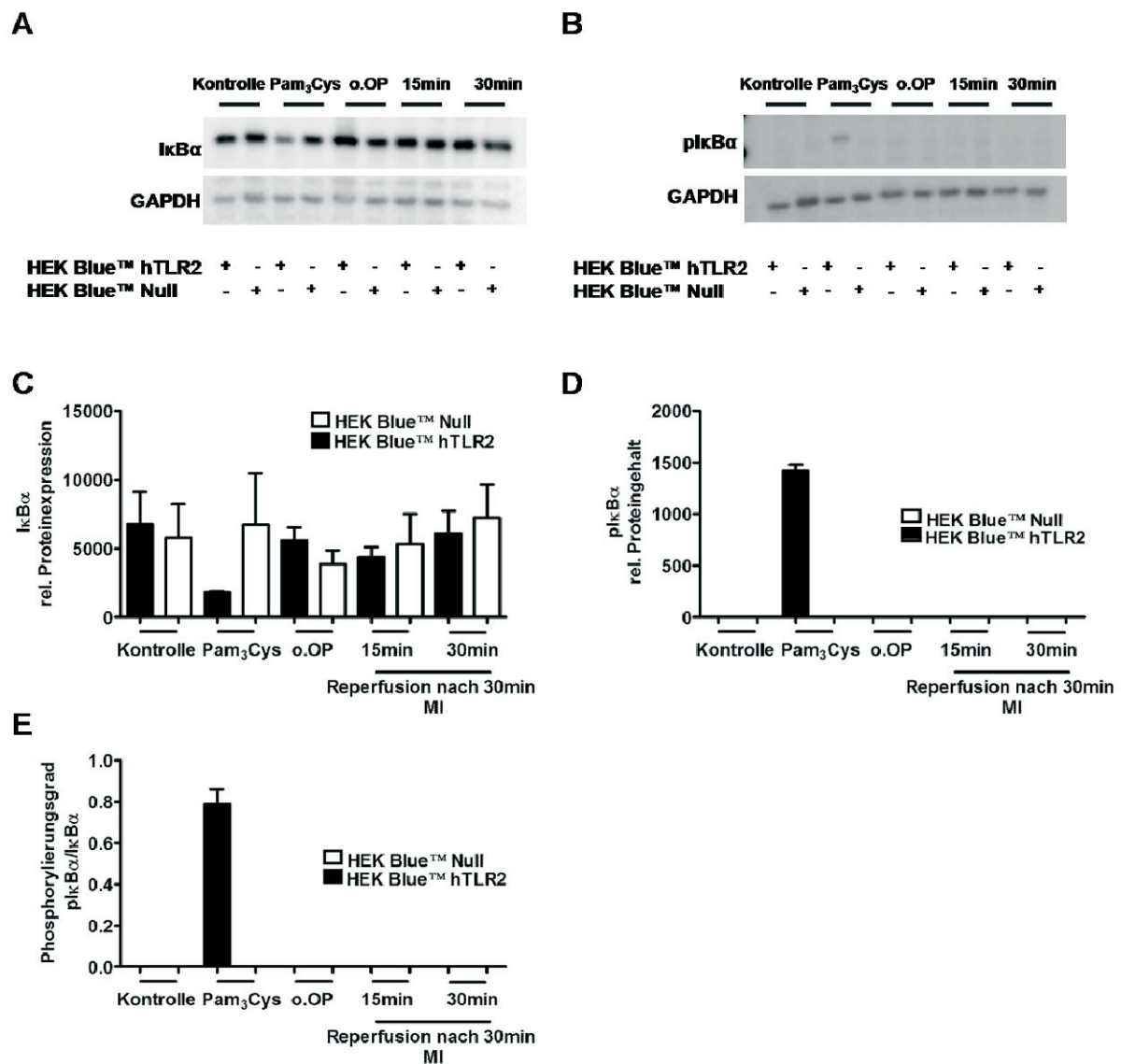


Abbildung 3.20: Proteinexpression von I κ B α und Proteingehalt von phosphorylierten I κ B α (pI κ B α) in HEK Blue™ hTLR2 Zellen nach Stimulation mit Plasma von MI/R-operierten Mäusen

Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 und -Null-Zellen für 4h mit 100 ng/ml Pam₃Cys und je 10% Plasma von unoperierten Mäusen und nach 30min Ischämie/15 bzw. 30min Reperfusion in Zellkulturmedium ohne fetales Kälberserum. Als Kontrolle wurde Zelllysat von Zellen verwendet, welche 4h in Zellkulturmedium ohne FCS kultiviert wurden.

Repräsentativer Western Blot für I κ B α (A) und pI κ B α (B) nach Stimulation. Densitometrische Auswertung der relativen Proteinexpression von I κ B α (C) und pI κ B α (D). Es wurden immer Proteinlysate von HEK Blue™ hTLR2 und HEK Blue™ Null im Wechsel aufgetragen. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. (E) Phosphorylierungsgrad als Quotient von pI κ B α /I κ B α . Die Daten wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n=2/Zelltyp).

Nachdem sich nach der Stimulation mit Plasma nach 30-minütiger Ischämie und den kurzen Reperfusionzeitpunkten 15 beziehungsweise 30 Minuten weder Abbau noch Phosphorylierung von I κ B α nachweisen ließen, wurden die Zellen mit Plasma von Mäusen nach 30-minütiger Ischämie und 2 und 10 Stunden Reperfusion sowie wiederum mit 100 ng/ml Pam₃Cys und 10% Plasma von Mäusen ohne OP stimuliert.

Die Western Blot-Analyse ergab auch bei dieser Stimulation Phosphorylierung und Abbau von I κ B α nach Pam₃Cys-Stimulation der HEK Blue™ hTLR2 Zellen, was sich auch in dem im Vergleich zur Kontrolle gesteigerten Phosphorylierungsgrad von I κ B α widerspiegelte (Abbildung 3.21). Die reduzierte Expression von I κ B α in den Pam₃Cys stimulierten HEK Blue™ Null Zellen wurde nicht von einem gesteigerten Proteingehalt an pI κ B α oder gesteigertem Phosphorylierungsgrad von I κ B α begleitet und wurde daher nicht als spezifische Reaktion auf eine TLR2-Aktivierung gewertet (Abbildung 3.21 C, E).

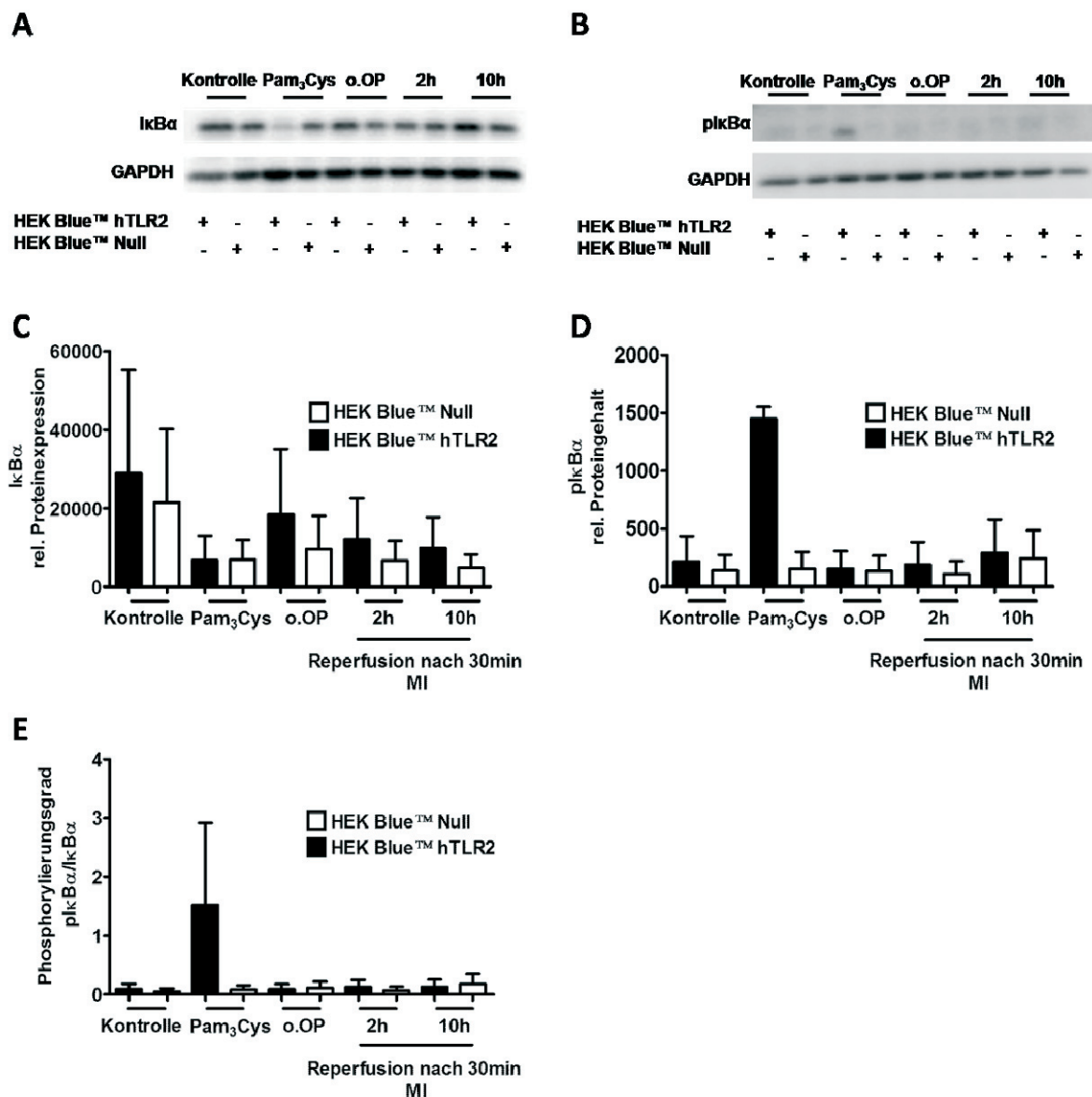


Abbildung 3.21: Proteinexpression von IκBα und Proteingehalt von phosphorylierten IκBα (plkBα) in HEK Blue™ hTLR2 Zellen nach Stimulation mit Plasma von MI/R-operierten Mäusen

Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 und -Null-Zellen für 4h mit 100 ng/ml Pam₃Cys und je 10% Plasma von unoperierten Mäusen und nach 30min Ischämie/2 bzw. 10h Reperfusion in Zellkulturmedium ohne fetales Kälberserum. Als Kontrolle wurde Zelllysate von Zellen verwendet, welche 4h in Zellkulturmedium ohne FCS kultiviert wurden.

Repräsentativer Western Blot für IκBα (A) und plkBα (B) nach Stimulation. Es wurden Proteinlysate von HEK Blue™ hTLR2- und HEK Blue™ Null Zellen im Wechsel aufgetragen. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Densitometrische Auswertung der relativen Proteinexpression von IκBα (C) und phosphoryliertem IκBα (plkBα) (D). (E) Phosphorylierungsgrad als Quotient von plkBα/IκBα. Die Daten wurden als Mittelwert +/- SEM dargestellt (n=2/Zelltyp).

3.6.3. Zytokinantwort nach Stimulation mit Mausplasma

Als weiterer Ansatz eine mögliche Aktivierung der HEK Blue™ hTLR2 Zellen nach Stimulation mit dem Plasma von Mäusen nach MI/R zu überprüfen, wurde die Zytokinantwort mittels *realtime* (RT)-qPCR überprüft. Hierfür wurden die Zellen zunächst für 24 Stunden in FCS-freiem Zellkulturmedium kultiviert und danach für 5, 10, 15 und 30 Minuten sowie 1, 2 und 4 Stunden mit 100 ng/ml Pam₃Cys stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die ohne zusätzliche Stimulation für 24 Stunden in FCS-freiem Zellkulturmedium kultiviert wurden. Um zu überprüfen, ob die gemessene Zytokinexpression eine TLR2-spezifische Antwort darstellt, wurden auch hier die HEK Blue™ Null Zellen mit Pam₃Cys stimuliert und die Zytokininduktion gemessen.

Nach Stimulation wurde die mRNA-Expression von CXCL2, IL 6, IL 8 und TNFα nach TLR2-Stimulation mittels RT-qPCR überprüft. Bei den HEK Blue™ hTLR2 Zellen wies die mRNA-Expression für CXCL2, IL 8 und TNFα bei allen drei Zytokinen einen Anstieg im Zeitverlauf der 4-stündigen Stimulation auf (Abbildung 3.22 A, B, D). Bei der mRNA-Expression von IL 6 ließ sich kein Anstieg nach Pam₃Cys-Stimulation nachweisen (Abbildung 3.22 C). Die Stimulation mit Pam₃Cys bewirkte in den HEK Blue™ Null Zellen keine Induktion der Zytokin-mRNA (Abbildung 3.23 A-D).

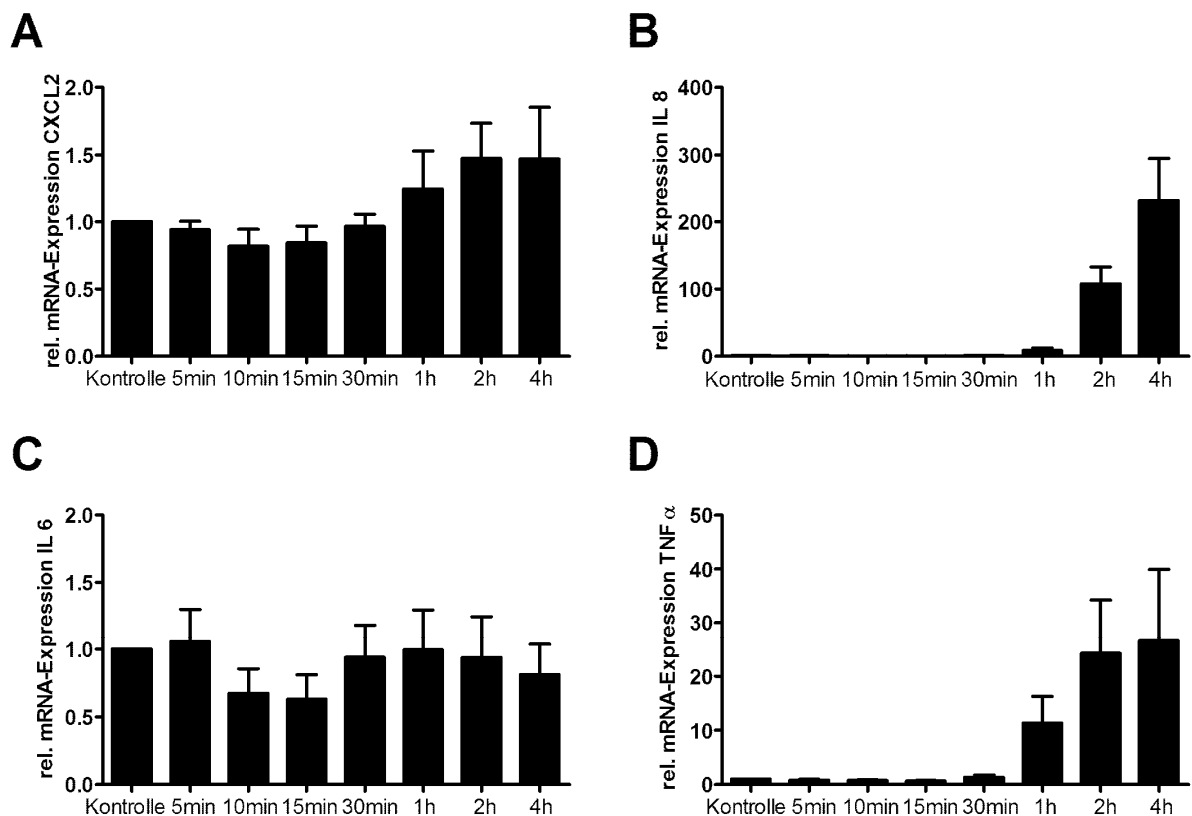


Abbildung 3.22: Relative Zytokin-mRNA-Expression nach Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit Pam₃Cys

HEK Blue™ hTLR2 Zellen wurden für 5, 10, 15 und 30min sowie 1, 2 und 4h mit jeweils 100 ng/ml Pam₃Cys in Zellkulturmedium ohne fetales Kälberserum (FCS) stimuliert und die mRNA-Expression von CXCL2 (A), IL 8 (B), IL 6 (C) und TNFα (D) mittels RT-qPCR überprüft. Als Kontrolle dienten Zellen, die ohne zusätzliche Stimulation in FCS-freiem Zellkulturmedium kultiviert wurden. Darstellung der Daten als Mittelwert +/- SEM (n=4).

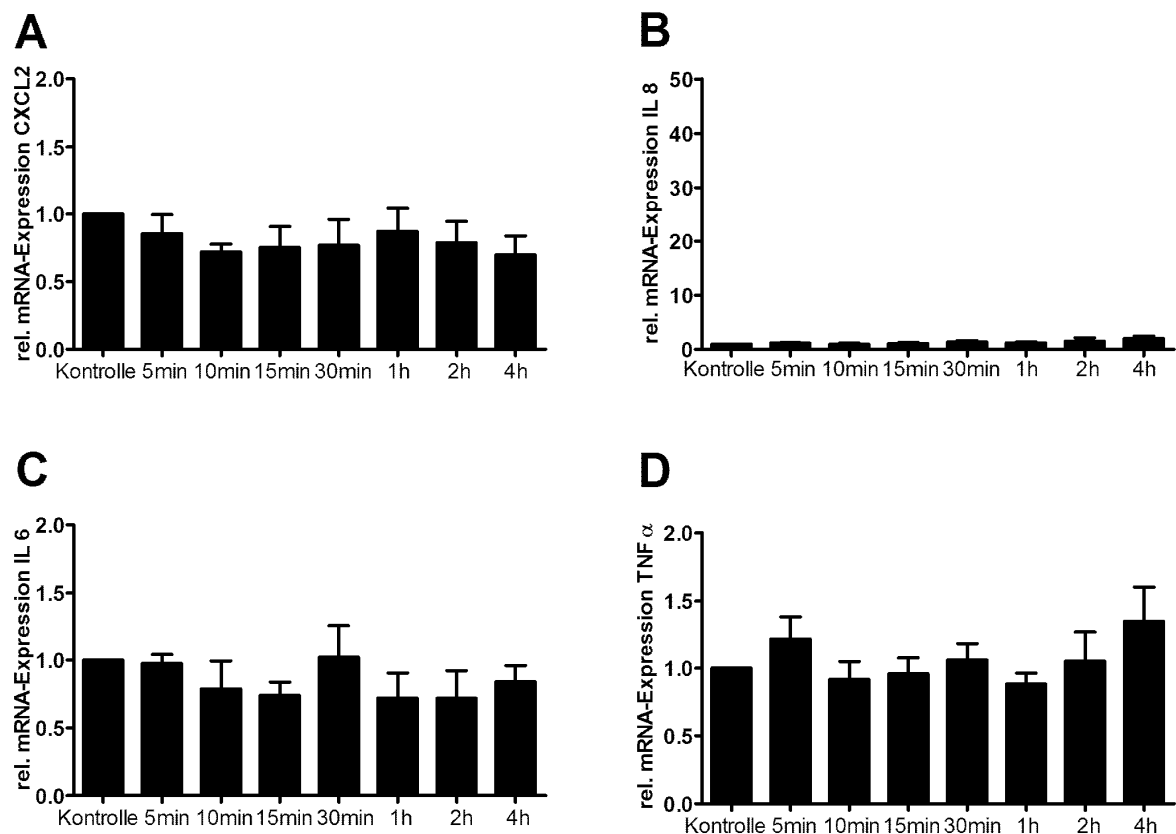


Abbildung 3.23: Zytokin-mRNA-Expression nach Stimulation von HEK Blue™ Null Zellen mit Pam₃Cys

HEK Blue™ Null Zellen wurden für 5, 10, 15 und 30min sowie 1, 2 und 4h mit jeweils 100 ng/ml Pam₃Cys in Zellkulturmedium ohne fetales Kälberserum (FCS) stimuliert und die mRNA-Expression von CXCL2 (A), IL 8 (B), IL 6 (C) und TNFα (D) mittels RT-qPCR überprüft. Als Kontrolle dienten Zellen, die ohne zusätzliche Stimulation in FCS-freiem Zellkulturmedium kultiviert wurden. Darstellung der Daten als Mittelwert +/- SEM (n=4).

Nachdem die 4-stündige Stimulation mit Pam₃Cys einen Anstieg der mRNA-Expression von IL 8 bewirkte und auch bei CXCL2 und TNFα eine Induktion der mRNA-Expression nachweisbar war, wurde diese Stimulationsdauer für die Stimulation der HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit dem Mausplasma verwendet. Die Zellen wurden in FCS-freiem Zellkulturmedium mit jeweils 10% Plasma von Mäusen nach 30-minütiger Ischämie und 15 und 30 Minuten sowie 2 und 10 Stunden Reperfusion stimuliert. Als Kontrolle dienten hier Zellen, welche mit 10% Plasma einer Maus, die keiner MI/R-Operation unterzogen wurde, stimuliert wurden.

Die Stimulation mit dem Plasma der Mäuse nach MI/R induzierte keine Zytokinantwort für CXCL2, IL 8 oder TNFα im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.24).

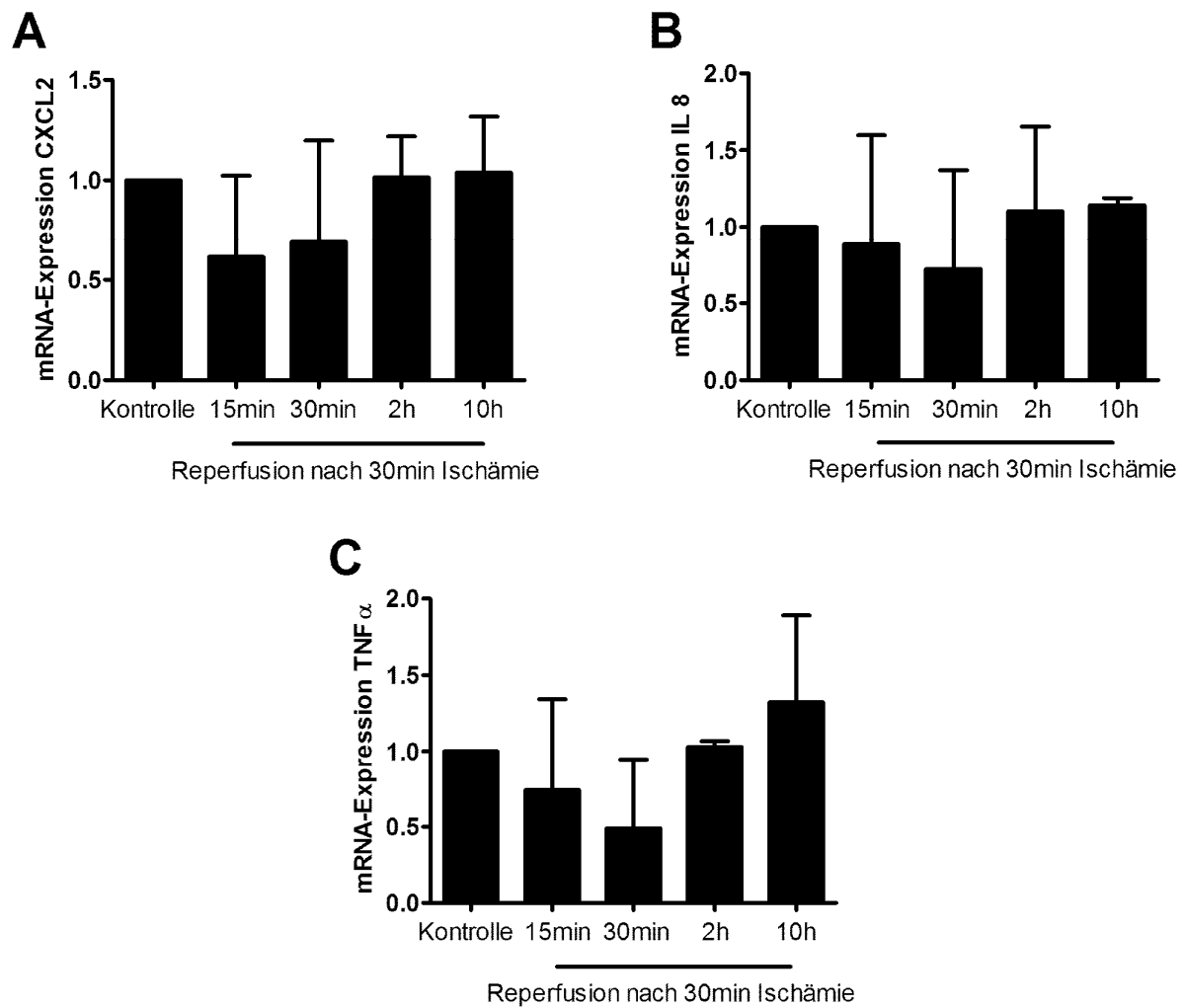


Abbildung 3.24: Zytokinantwort nach Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit Mausplasma nach MI/R

4-stündige Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit 10% Plasma von Mäusen nach 30min Ischämie und 15 und 30min sowie 2 und 10h Reperfusion in Zellkulturmedium ohne fetales Kälberserum (FCS). Bei der Kontrolle wurde das FCS-freie Zellkulturmedium mit 10% Plasma einer unoperierten Maus versetzt. Die mRNA-Expression der Zytokine CXCL2 (A), IL8 (B) und TNF α (C) wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM (n=2).

3.6.4. Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Mausplasma

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die fehlende SEAP-Aktivierung nach Stimulation mit Plasma auf eine zu geringe Menge an eingesetztem Plasma zurückzuführen ist, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Mausplasma, das heißt beginnend mit 10% bis 50% des Mediums oder mit 100 ng/ml Pam₃Cys stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die 24 Stunden in FCS-freiem Medium kultiviert wurden. Neben dem Plasma von MI/R operierten Mäusen (Abbildung 3.25 C-F) wurde Plasma von Mäusen ohne OP (Abbildung 3.25 B) sowie hitzeinaktiviertes FCS (Abbildung 3.25 A) zur Stimulation verwendet. Während Pam₃Cys eine deutliche SEAP-Antwort auslöste, war bei den Plasma-stimulierten Zellen keine Steigerung der SEAP-Sekretion im Vergleich zur Kontrolle detektierbar.

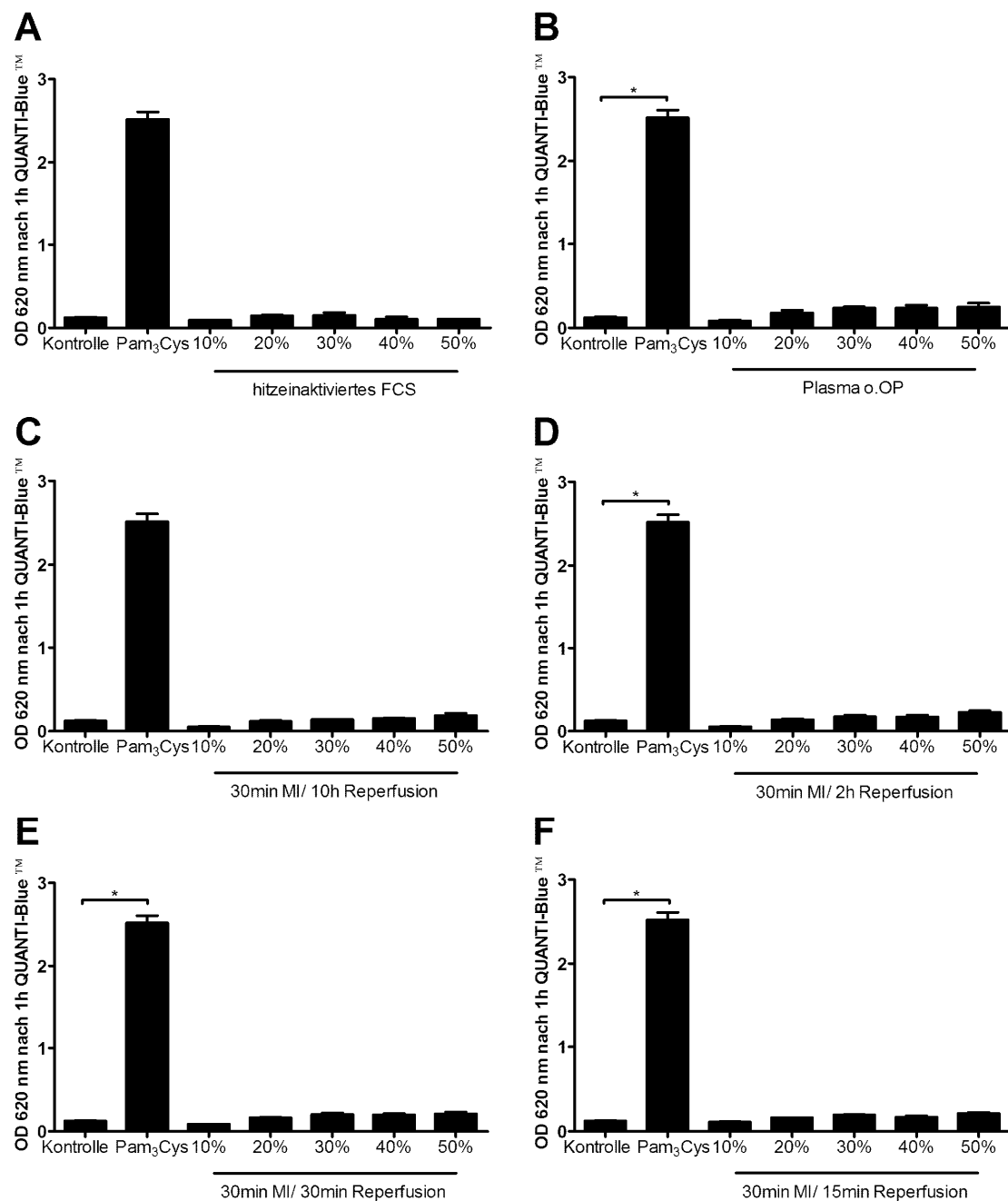


Abbildung 3.25: Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Plasma oder FCS

Stimulation von HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit 100 ng/ml Pam₃Cys sowie verschiedenen Konzentrationen hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) (A), Plasma von Mäusen ohne OP (B) sowie nach 30min Ischämie/10h (C), 2h (D), 30min (E) oder 15min Reperfusion (F) für 24h. Als Kontrolle dienten Zellen, die für 24h in FCS-freiem Medium kultiviert wurden. Die Menge an SEAP im Zellüberstand wurde mittels QUANTI-Blue™-Detektionsmedium über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 620nm bestimmt. Darstellung der Daten als Mittelwert +/- SEM. Signifikanzen wurden mittels Kruskal-Wallis Test mit nachfolgendem Dunn's *Multiple Comparison Test* ermittelt. *p<0,05.

3.6.5. Stimulation von THP1X Blue™ Zellen mit Mausplasma

Mit den THP1X Blue™ Zellen sollte neben den HEK Blue™ hTLR2 Zellen auch ein monozytäres Zellsystem mit dem Plasma der MI/R-operierten Mäuse stimuliert werden. Nachdem die Stimulation mit Pam₃Cys nach 22 Stunden Stimulation eine deutliche Induktion der SEAP-Sekretion in THP1X Blue™ Zellen induzierte (Abbildung 3.9), wurde diese Stimulationsdauer auch für die Stimulation mit dem Plasma der operierten Mäuse verwendet. Dabei wurden die Zellen mit 10% Plasma von Mäusen ohne OP, nach *sham*-OP und 30-minütiger Ischämie und 15 und 30 Minuten, 10 und 24 Stunden Reperfusion sowie mit 100ng/ml Pam₃Cys in FCS-freiem Zellkulturmedium stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationsdauer wurden jeweils 20µl Zellüberstand für 1 Stunde mit QUANTI-Blue™-Detektionsmedium inkubiert und die OD bei 620nm gemessen. Nach Stimulation mit Pam₃Cys ließ sich eine deutliche SEAP-Sekretion im Zellüberstand nachweisen, während die Stimulation mit Plasma von unoperierten und operierten Tieren keine nachweisbare Sekretion von SEAP auslöste (Abbildung 3.26).

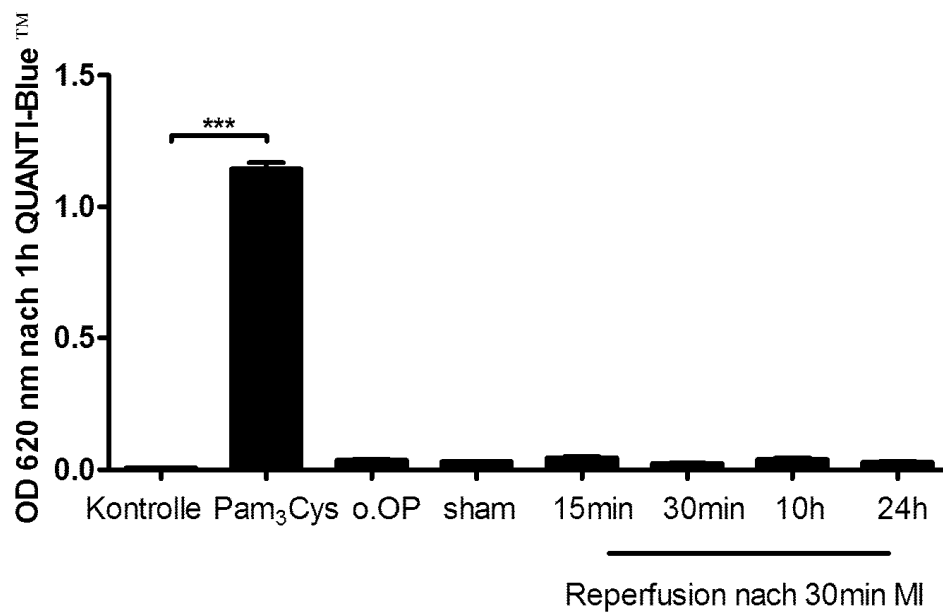


Abbildung 3.26: SEAP-Sekretion nach Stimulation von THP1X Blue™ Zellen mit Plasma von Mäusen nach MI/R

Stimulation von THP1X Blue™ Zellen für 22h mit 100 ng/ml Pam₃Cys oder 10% Plasma von Mäusen ohne OP, *sham*-OP oder 30min myokardiale Ischämie (MI) und 15min, 30min, 10h oder 24h Reperfusion in Zellkulturmedium ohne fetales Kälberserum (FCS). Als Kontrolle wurden Zellen verwendet die über 22h ohne zusätzliche Stimulation in FCS-freiem Zellkulturmedium kultiviert wurden. Die Menge an SEAP im Zellüberstand wurde mittels QUANTI-Blue™-Detektionsmedium über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 620nm bestimmt. Darstellung der Daten als Mittelwert +/- SEM (n=3-4 in Duplikaten). Signifikanz wurde mittels *student's* t-Test ermittelt. ***p<0,001

3.7. Stimulation von RAW264.7 Makrophagen mit Mausplasma

Neben den THP1X Blue™ Zellen wurden auch RAW264.7 Makrophagen mit dem Mausplasma stimuliert, um die Möglichkeit auszuschließen, dass die fehlende SEAP-Aktivierung nach der Stimulation mit dem Plasma auf den Speziesunterschied zwischen möglichen Liganden im Plasma der Maus und den humanen TLR auf den THP1X Blue™ Zellen zurückzuführen war. Als Indikator für die NFκB-Aktivierung nach Stimulation von TLR2 oder TLR4 wurden die Expression und Phosphorylierung von IκBα mittels Western Blot analysiert.

Um die Stimulationsdauer zu ermitteln, bei der nach TLR2-Aktivierung sowohl Phosphorylierung als auch Abbau von IκBα zu detektieren sind, wurden die RAW264.7 Makrophagen zunächst für 24 Stunden in FCS-freiem Zellkulturmedium kultiviert und dann für 5, 10, 15 und 30 Minuten, 1, 2, 4, 8 und 12 Stunden mit jeweils 100ng/ml Pam₃Cys in FCS-

freiem Zellkulturmedium stimuliert. Nach Stimulation wurde das Proteinlysate der Zellen mittels Western Blot auf die Expression von I κ B α sowie auf den Proteingehalt von phosphoryliertem I κ B α untersucht. Als Kontrolle wurde das Proteinlysate von Zellen verwendet, die über 24 Stunden ohne zusätzliche Stimulation in FCS-freiem Zellkulturmedium kultiviert wurden.

Nach 30-minütiger Stimulation wurde eine deutlich reduzierte relative Proteinexpression von I κ B α nachgewiesen (Abbildung 3.27 C). Die Errechnung des Phosphorylierungsgrades mit Hilfe des Quotienten aus dem relativen Proteingehalt an pI κ B α (Abbildung 3.27 D) und der relativen Proteinexpression von I κ B α ergab, dass zu diesem Zeitpunkt I κ B α nahezu vollständig phosphoryliert ist (Abbildung 3.27 E). Aus diesem Grund wurden 30 Minuten als optimale Stimulationsdauer für die Prüfung der NF κ B-Aktivierung nach I κ B α Phosphorylierung und Degradation gewertet und für die Stimulation mit dem Plasma operierter Mäuse verwendet.

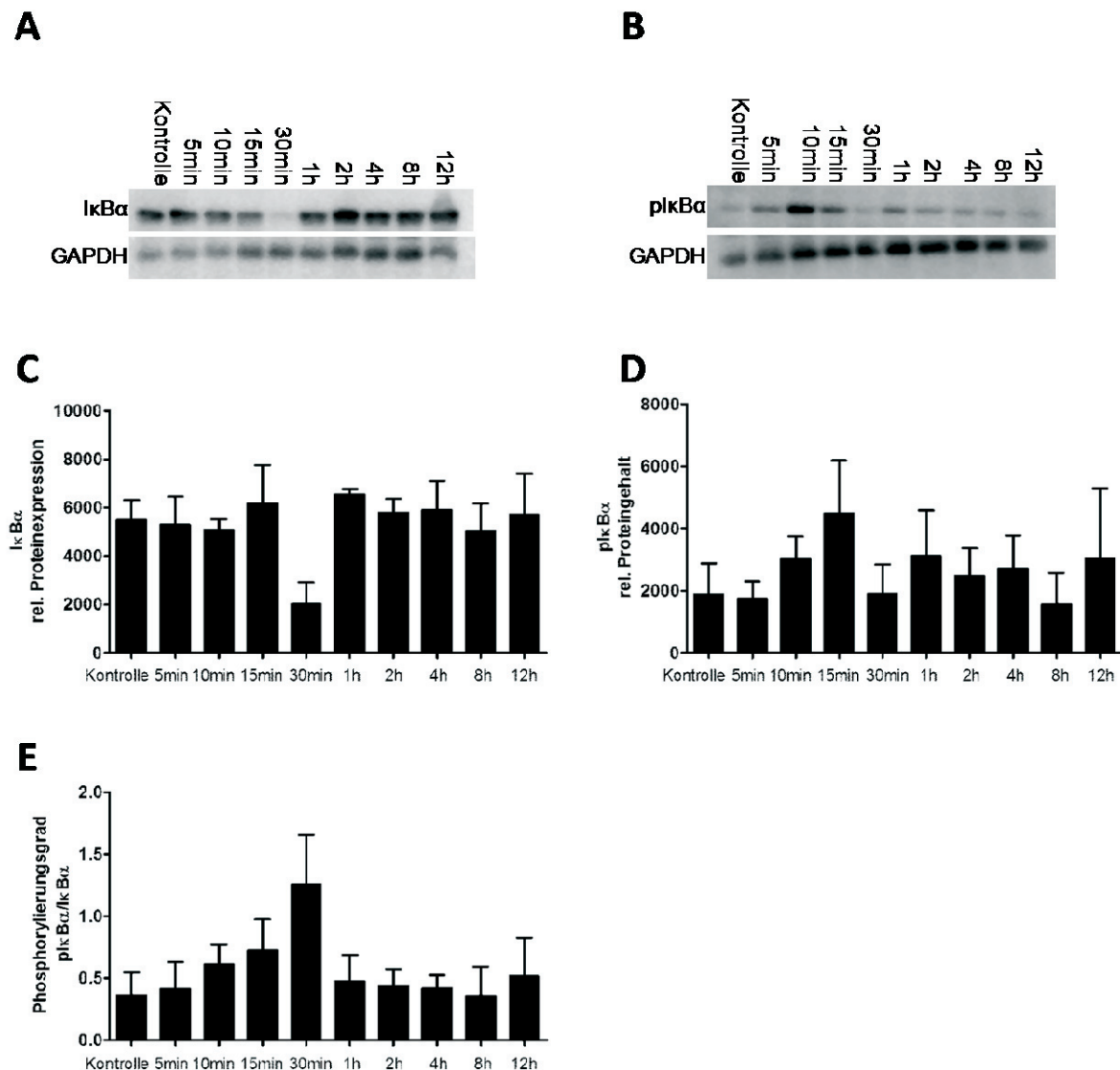


Abbildung 3.27: Western Blot für IκBα und phosphoryliertes IκBα (pIκBα) nach Stimulation von RAW264.7 Makrophagen mit Pam₃Cys

Stimulation von RAW264.7 Makrophagen mit jeweils 100 ng/ml Pam₃Cys für 5min, 10min, 15min, 30min, 1h, 2h, 4h, 8h und 12h. Das Proteinlysate wurde mittels Western Blot auf die relative Proteinexpression von IκBα (A, C) sowie auf den Proteingehalt an pIκBα (B, D) untersucht.

(A) Repräsentativer Western Blot für IκBα. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. (C) Densitometrische Auswertung der Western Blots für die relative Proteinexpression von IκBα nach Stimulation mit Pam₃Cys (n=3). (B) Repräsentativer Western Blot für pIκBα nach Pam₃Cys-Stimulation. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. (D) Densitometrische Auswertung der Western Blots für den relativen Proteingehalt an pIκBα (n=3). (E) Phosphorylierungsgrad von IκBα als Quotient aus pIκBα/IκBα. (n=3). Darstellung der Daten als Mittelwert +/- SEM.

Danach wurden die RAW264.7 Makrophagen zunächst für 24 Stunden in FCS-freiem Zellkulturmedium kultiviert und danach für 30 Minuten mit jeweils 100 ng/ml Pam₃Cys oder 10% Mausplasma in FCS-freiem Zellkulturmedium stimuliert. Dabei wurde Plasma einer unoperierten Maus sowie Plasma von Mäusen nach *sham*-OP oder nach 30-minütiger Ischämie und 15 und 30 Minuten, 2 oder 10 Stunden Reperfusion verwendet. Nach 30-minütiger Stimulation wurde das Proteinlysate mittels Western Blot auf die relative Proteinexpression von IκBα sowie dem relativen Proteingehalt an phosphoryliertem IκBα analysiert. Als Kontrolle wurde auch hier das Proteinlysate von Zellen verwendet, die für 24 Stunden ohne zusätzliche Stimulation in FCS-freiem Zellkulturmedium kultiviert wurden.

Bei den Pam₃Cys-stimulierten Zellen ließ sich nach 30-minütiger Stimulation eine deutliche Reduktion der relativen Proteinexpression von IκBα (Abbildung 3.28 A, C) sowie eine gesteigerte Phosphorylierungsrate von IκBα nachweisen (Abbildung 3.28 E). Nach Stimulation mit dem Mausplasma konnten keine Veränderungen in der Proteinexpression oder im Phosphorylierungsgrad von IκBα detektiert werden, welche auf eine Aktivierung von NFκB hingewiesen hätten, da sich die Unterschiede im Proteingehalt von pIκBα nicht in einer veränderten Phosphorylierungsrate widerspiegeln (Abbildung 3.28).

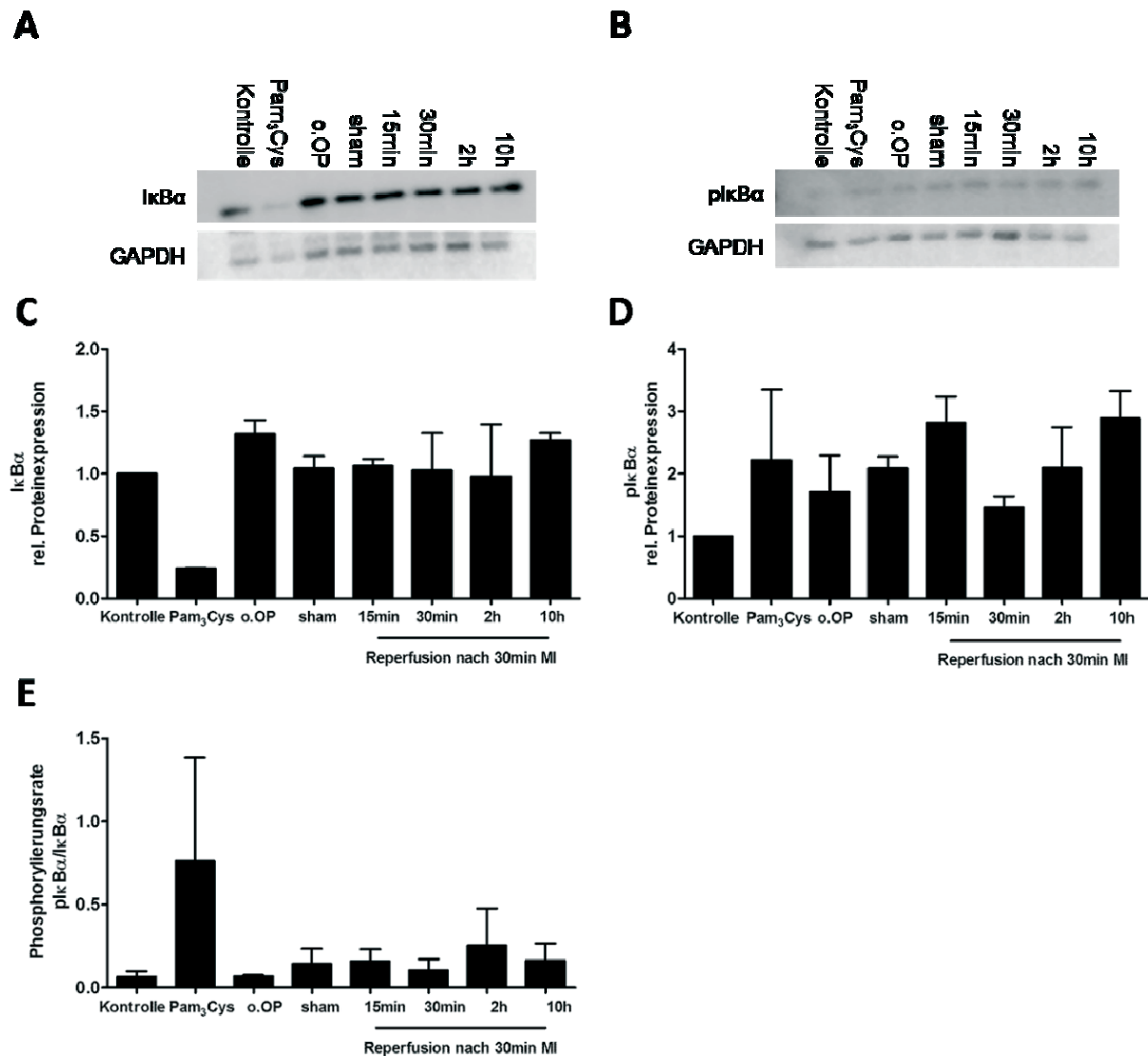


Abbildung 3.28: Western Blot für IkBa und phosphoryliertes IkBa (pIkBa) nach Stimulation von RAW264.7 Makrophagen mit Mausplasma

RAW264.7 Makrophagen wurden für 30min mit 100 ng/ml Pam₃Cys oder je 10% Plasma von Mäusen ohne OP, nach *sham*-OP oder nach 30min myokardialer Ischämie (MI) und 15min, 30min, 2h oder 10h Reperfusion in Zellkulturmedium ohne fetales Kälberserum (FCS) stimuliert. Das Proteinlysate wurde mittels Western Blot-Analyse auf die relative Proteinexpression von IkBa und den relativen Proteingehalt an pIkBa untersucht. Des Weiteren wurde der Phosphorylierungsgrad als Quotient aus pIkBa und IkBa errechnet.

Densitometrische Auswertung der Western Blots für die relative Proteinexpression von IkBa (A) und den relativen Proteingehalt an pIkBa (C) (jeweils n=2). (B) Repräsentativer Western Blot für IkBa nach Stimulation mit Pam₃Cys und Plasma. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. (D) Repräsentativer Western Blot für pIkBa nach Stimulation mit Pam₃Cys und Plasma. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. (E) Phosphorylierungsgrad von IkBa. Darstellung der Daten als Mittelwert +/- SEM.

4. Diskussion

Das „Reperfusionssyndrom“ ist maßgeblich an dem Ausmaß der Schädigung des Myokards nach MI/R beteiligt [11]. Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen sind sehr vielfältig und werden durch die Beteiligung einer Vielzahl verschiedener Signalwege charakterisiert.

Es wurden bereits verschiedene Ansätze untersucht, um den Ausgang von MI/R zu modifizieren. Diese Ansätze umfassten unter anderem die Modifikation des „*Calcium Overloads*“ mittels Anwendung von Kalzium-Kanal-Blockern, der ROS-Produktion durch Inhibition der Xanthinoxidase mit Allopurinol oder der Inflammationsantwort z.B. durch pharmakologische Inhibition der Leukozytenakkumulation im Infarktgebiet [11, 116].

Bislang konnte jedoch keiner dieser Ansätze erfolgreich in den klinischen Alltag übertragen werden [19]. Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass auch Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr, wie die TLRs, im Verlauf von Ischämie und Reperfusion eine Rolle spielen [80, 82]. So ließ sich bei TLR2-defizienten und mit TLR2-Antikörper-behandelten Mäusen ein deutlich reduzierter myokardialer Schaden nach MI/R nachweisen. Die protektiven Effekte wurden bisher einer verminderten leukozytären Infiltration, einer reduzierten ROS-Produktion sowie einer geringeren Inzidenz kardialer Rhythmusstörungen nach MI/R zugeschrieben [82, 83, 86, 117]. In dieser Arbeit konnten wir nun zeigen, dass die Reduktion der Infarktgröße in der TLR2^{-/-}-Maus auch durch den PI3K/Akt-Signalweg vermittelt wird.

Verschiedene Gruppen konnten bereits einen Zusammenhang zwischen TLR2 und der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs nachweisen [60, 66]. Des Weiteren konnte bei TLR4-defizienten Mäusen die Infarktgrößenreduktion nach MI/R durch Inhibition von PI3K mit Wortmannin aufgehoben werden [89]. In der vorliegenden Arbeit wurden nun die Auswirkungen einer pharmakologischen Inhibition von PI3K und Akt auf die Reduktion des myokardialen Schadens untersucht.

Entsprechend der Ergebnisse, die in der Literatur beschrieben sind, konnten auch wir in dieser Studie eine Reduktion des myokardialen Schadens in den Vehikel-behandelten TLR2^{-/-}-Tieren nachweisen, was sich in Form einer reduzierten Infarktgröße sowie einem reduzierten Troponin T-Spiegel zeigen ließ. Wie in den TLR4^{-/-}-Tieren in der Studie von Hua et al. führte auch in TLR2^{-/-}-Tieren die pharmakologische Inhibition von PI3K mit Wortmannin zu der

Aufhebung der protektiven Effekte nach MI/R. Die Beteiligung des PI3K/Akt-Signalwegs an der Kardioprotektion im *knockout* ließ sich weiterhin dadurch zeigen, dass diese auch durch die Inhibition von Akt mittels Akt Inhibitor V aufgehoben werden konnte.

Der Akt Inhibitor V kam in dieser Studie erstmals im Rahmen einer MI/R-Studie zum Einsatz. Dies ist insbesondere bemerkenswert, da Wortmannin zwar ein potenter Inhibitor für PI3K ist, aber es jedoch auch bekannt ist, dass es auch andere Enzyme hemmen kann, die eine PI3K-homologe Struktur aufweisen. Dies sind unter anderem Enzyme wie die humane DNA-abhängige Kinase oder die *myosin-light-chain* Kinase sowie mTOR, ein im PI3K/Akt-Signalweg nachgeschaltetes Protein [118]. Außerdem wird durch die Phosphorylierung von PIP₂ zu PIP₃ nicht nur Akt und sein Aktivator PDK1 an die Plasmamembran rekrutiert, sondern auch noch eine Reihe von anderen Signalmolekülen, die eine Pleckstrin-Homologie-Domäne aufweisen, wie etwa GDP-GTP-Austauschfaktoren für Rac oder den *ADP-ribosylating factor 6* [63]. Somit war durch die Anwendung des Akt Inhibitors V eine spezifischere Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs möglich.

Fujio et al. und andere konnten zeigen, dass die Aktivierung von Akt sowohl positive Effekte auf das Überleben von Kardiomyozyten *in vitro* als auch auf das Ausmaß der myokardialen Schädigung *in vivo* hat [87, 88, 119].

Die Analyse der Proteinexpression von Akt1 ergab sowohl in Herzen von Tieren ohne OP, als auch in Herzen von Tieren nach 30-minütiger Ischämie und 4- beziehungsweise 24-stündiger Reperfusion eine signifikant gesteigerte Akt1-Proteinexpression und Phosphorylierung in TLR2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Da sowohl Akt1 als auch phospho-Akt1 im *knockout* erhöht waren, ergab sich kein Unterschied im Phosphorylierungsgrad zwischen beiden Gruppen.

Die Behandlung mit dem Akt-Inhibitor resultierte wie in der Literatur beschrieben in einer geringeren Phosphorylierung von Akt1 [113, 120]. Auffällig war dabei, dass neben dem phosphorylierten Akt1 auch die Proteinexpression von Akt1 durch die Behandlung mit dem Akt-Inhibitor deutlich reduziert wurde. Dieser Effekt wurde bislang nicht beschrieben.

Korrelationsanalysen zeigten deutliche Zusammenhänge zwischen der Infarktgröße und der Proteinexpression und Phosphorylierung von Akt1 nach 4 Stunden Reperfusion in den Vehikel-behandelten Tieren. So war die reduzierte Infarktgröße in den TLR2^{-/-}-Tieren mit einer gesteigerten Akt1-Proteinexpression verbunden. Die Korrelation ließ sich durch die Behandlung mit dem Akt-Inhibitor aufheben. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass

die protektiven Effekte, die in TLR2-defizienten Mäusen beobachtet werden können, auf die vermehrte Proteinexpression von Akt1 zurückzuführen ist.

Diese Daten stehen den Ergebnissen von Ha et al. teilweise entgegen. Die Autoren beschrieben als erste Gruppe einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von TLR2 und der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs bei MI/R. Auffällig war in dieser Studie, dass entgegen dem in der Literatur bereits vielfach beschriebenen und auch hier gezeigten kardioprotektiven Effekt der TLR2-Defizienz, dort keine Reduktion der Infarktgröße im TLR2-*knockout* nach MI/R nachweisbar war.

Die Gruppe erklärt sich dies in den unterschiedlichen MI/R-Modellen, da sie im Gegensatz zu anderen Gruppen die Tiere einer 60-minütigen Ischämie und 4-stündigen Reperfusion unterzogen. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse schließen die unterschiedliche Reperfusionsdauer der Studie von Ha et al. im Vergleich zu anderen Studien als Ursache für die fehlende Protektion im *knockout* aus, da auch hier eine Reperfusionsdauer von 4 Stunden angewendet wurde [83, 86, 90]. Somit bleibt zwischen der hier gezeigten Studie und der Studie von Ha et al. nur der Unterschied in der Dauer der Ischämie. Vor dem Hintergrund, dass wir nach Vergleich verschiedener MI/R Studien zeigen konnten, dass nach 24 Stunden Reperfusion keine Korrelation der Infarktgröße mit der Dauer der Ischämie nachweisbar war, ist die Möglichkeit, den Unterschied in der Dauer der Ischämie als Erklärung für die fehlende Protektion zu werten, als unwahrscheinlich zu erachten [121]. Weiterhin zeigte die Gruppe, dass durch die Vorbehandlung von WT-Tieren mit den TLR2-Agonisten Pam₃Cys oder Peptidoglykan 1 Stunde vor der Ischämie eine Reduktion der Infarktgröße erreicht werden konnte. Da dieser Effekt in TLR2-defizienten Tieren nicht nachweisbar war, schlussfolgerten Ha et al., dass die Protektion direkt über Aktivierung von TLR2 vermittelt wurde [90].

Der protektive Effekt der TLR2-Aktivierung ist im Zusammenhang mit der Präkonditionierung bekannt. Bei der klassischen Präkonditionierung wird durch mehrere kurze Ischämie/Reperfusionszyklen vor der Ischämie eine Verringerung der Infarktgröße erreicht [122]. Ähnliche Effekte lassen sich auch durch die Behandlung mit den TLR2-Liganden Lipoteichonsäure oder Pam₃Cys erreichen [123, 124]. Positive Effekte wurden allerdings bislang nur bei Vorbehandlung 8-24 Stunden vor der Ischämie beschrieben. So ließ sich durch Behandlung mit Lipoteichonsäure 2 Stunden vor der Ischämie keine Reduktion der Infarktgröße erreichen [124].

Ha et al. zeigten außerdem, dass sich die Protektion nach Vorbehandlung mit Peptidoglykan durch die pharmakologische Inhibition von PI3K mit Wortmannin aufheben ließ, was den Schluss zuließ, dass die protektiven Effekte der TLR2-Aktivierung bei MI/R über die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs vermittelt werden [90]. In der vorliegenden Arbeit ließ sich die Protektion, welche in den TLR2-defizienten Tieren nachweisbar war, durch die Behandlung mit Wortmannin aufheben. Wortmannin ist zwar ein potenter Inhibitor für PI3K, jedoch wie bereits oben erwähnt nicht besonders spezifisch, da er auch andere Signalwege beeinflusst. Aufgrund dieser geringen Spezifität wurden neben den Auswirkungen der Inhibition von PI3K mit Wortmannin in der vorliegenden Studie auch die Effekte der Inhibition von Akt auf die Ausprägung der myokardialen Schädigung untersucht. Auch dabei ließ sich die Reduktion der Infarktgröße im TLR2-*knockout* aufheben. Diese zweite, spezifischere Intervention im PI3K/Akt-Signalweg belegt dessen Rolle für die Protektion in TLR2^{-/-}-Tieren. Da Ha et al. protektive Effekte durch TLR2-Aktivierung beschrieben, die über eine Induktion des PI3K/Akt-Signalwegs vermittelt wurden, scheinen sich die Ergebnisse dieser beiden Studien auszuschließen, wobei anzumerken ist, dass die von Ha et al. publizierten Daten auch den Ergebnissen von Fravre, Arslan und Sakata et al. widersprechen [82, 84, 86, 90].

Die vorliegende Studie zeigt jedoch weniger eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges, sondern vielmehr eine konstitutionell vermehrte Akt1-Expression in TLR2-defizienten Mäusen. Dies ließ sich durch die enge Korrelation der Infarktgröße mit der Akt1-Proteinexpression beziehungsweise die Aufhebung dieser bei Akt-Inhibition nachweisen. Da auf mRNA-Ebene keine gesteigerte Expression von Akt in TLR2^{-/-}-Tieren nachweisbar war, muss die vermehrte Proteinexpression entweder auf eine, in TLR2-*knockout*-Tieren eventuell kompensatorisch veränderte translationale oder posttranslationale Regulation, wie zum Beispiel einen verminderten Abbau von Akt zurückzuführen sein.

Die Tatsache, dass bei TLR2-defizienten Tieren eine geringere myokardiale Schädigung nachgewiesen werden konnte als bei vergleichbaren WT-Tieren, lässt darauf schließen, dass es im WT im Verlauf von MI/R zu einer Aktivierung von TLR2 kommt [82, 83, 86]. Dies lässt sich zusätzlich durch Studien unterstützen, die zeigen konnten, dass NFκB, welches unter anderem durch TLR2 aktiviert wird, das Ausmaß der Myokardschädigung beeinflusst [30, 75, 76]. Es ist bekannt, dass TLR2 neben mikrobiellen Bestandteilen auch endogene Liganden erkennt. Einer dieser potentiellen Liganden ist das extrazelluläre Matrixmolekül Biglykan.

Schäfer et al. konnten zeigen, dass Biglykan sowohl ein Ligand für TLR2 als auch für TLR4 ist [35]. Eine Studie, an der auch unsere Arbeitsgruppe beteiligt war, konnte bereits zeigen, dass sieben Tage nach permanentem Infarkt eine vermehrte Biglykan-Expression im linken Ventrikel auftritt und dass eine genetischer *knockout* von Biglykan mit einem vermehrten Auftreten von ventrikulären Rupturen in den ersten drei Tagen nach permanentem Infarkt verbunden ist. Nach permanentem Infarkt war in dieser und einer weiteren Studie kein Unterschied in der Infarktgröße nachweisbar [103, 125]. Eine verringerte leukozytäre Infiltration in der Infarktpenumbra der Biglykan-defizienten Tiere gab Anlass zu der Hypothese, dass der genetische *knockout* von Biglykan auch das myokardiale Reperfusionssyndrom positiv beeinflussen könnte [103]. In dieser Arbeit sollten nun die Rolle von Biglykan als potentieller Ligand für TLR2 auf die myokardiale Schädigung nach 30-minütiger Ischämie und 24-stündiger Reperfusion untersucht werden, um neben den Auswirkungen einer myokardialen Ischämie, die bereits in den genannten Studien untersucht wurde, auch die zusätzliche Schädigung infolge des „Reperfusionssyndroms“ zu analysieren.

Nach 30-minütiger Ischämie und 24-stündiger Reperfusion ließ sich wie nach permanentem Infarkt kein Unterschied zwischen der Schädigung des Herzens bei WT- und Bgn^{-/-}-Tieren in Bezug auf Infarktgröße und Troponin T-Spiegel im Plasma nachweisen.

Die Untersuchung der basalen Proteinexpression und der Proteinexpression nach 30-minütiger Ischämie und 24 Stunden Reperfusion ergab für TLR2 keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und Bgn^{-/-}. Auffällig war jedoch, dass nach 30-minütiger Ischämie und 2-stündiger Reperfusion die TLR2-Proteinexpression im Bgn^{-/-} sowohl in der AR, als auch in der ANR signifikant geringer war als im WT.

Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass die Stimulation mit mikrobiellen Liganden zu einer vermehrten Expression von TLR2 führt [126, 127]. Weiterhin wurde nach renaler Ischämie/Reperfusion eine vermehrte Expression von TLR2 in der Niere nachgewiesen [128]. Die verminderte Proteinexpression von TLR2 bei Fehlen eines Liganden wurde bislang nicht beschrieben, zeigt aber möglicherweise eine geringere Aktivierung des Rezeptors. Da dieser Effekt nur nach 2-stündiger Reperfusion und sowohl in der AR als auch in der ANR auftrat, liegt der Schluss nahe, dass die Biglykan-vermittelte TLR2-Aktivierung und konsekutive Hochregulation ausbleibt und dass das Biglykan-Signal auch außerhalb des Ischämiegebietes – etwa durch systemische Freisetzung des Liganden – nachweisbar ist. Auf die Messung der

Infarktgröße nach 2-stündiger Reperfusion wurde verzichtet, da zu diesem Reperfusionszeitpunkt noch keine zuverlässige Aussage über das Ausmaß des myokardialen Schadens getroffen werden kann. Dies zeigten Redel et al., die nach 30-minütiger Ischämie zeigen konnten, dass die Infarktgröße nach 2 Stunden Reperfusion noch wesentlich kleiner war als nach 4 Stunden [129]. Da der Effekt bereits nach 24-stündiger Reperfusion nicht mehr nachweisbar ist und in *Bgn*^{-/-}-*knockout*-Tieren keine Protektion bezüglich des myokardialen Schadens wie in *TLR2*-*knockout*-Tieren gezeigt werden konnte, scheint die verminderte *TLR2*-Proteinexpression nach 2 Stunden nicht ausreichend für eine messbare Verminderung des Reperfusionsschadens zu sein.

Nachdem in den *TLR2*-defizienten Tieren eine deutlich erhöhte Akt1-Proteinexpression nachgewiesen werden konnte, wurde diese auch in den Biglykan-defizienten Tieren überprüft. In *Bgn*^{-/-}-Herzen konnte im Vergleich zum WT nach 30-minütiger Ischämie und 24-stündiger Reperfusion keine veränderte Akt1-Proteinexpression nachgewiesen werden. Da in diesen Tieren keine Protektion nach MI/R nachgewiesen werden konnte, unterstützt dies auch das Ergebnis, dass die Kardioprotektion in den *TLR2*^{-/-}-Tieren maßgeblich durch die vermehrte Proteinexpression von Akt1 beeinflusst wird.

Der fehlende protektive Effekt im *knockout* weist darauf hin, dass Biglykan während des MI/R in Bezug auf die akute Ausprägung des Myokardschadens nach 24-stündiger Reperfusion keine, beziehungsweise nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die vermehrte Biglykanexpression, welche von Westermann et al. nach permanentem Infarkt beschrieben wurde, ist wahrscheinlich nur auf die Rolle von Biglykan als für die Gewebeintegrität wichtiges Matrixmolekül im Verlauf der Narbenbildung nach myokardialer Ischämie zurückzuführen [103].

Wie bereits erwähnt, liegt durch den protektiven Effekt der *TLR2*-Defizienz bei MI/R der Schluss nahe, dass im Verlauf von MI/R durch die Schädigung des Myokards potentielle Liganden für *TLR2* freigesetzt werden und so zu einer Aktivierung von *TLR2* führen, so dass die myokardiale Schädigung verstärkt wird. Biglykan konnte in dieser Arbeit zumindest als prominentester Ligand bei MI/R ausgeschlossen werden. Neben der Identifikation möglicher Liganden bleibt bislang die Frage offen, ob potentielle Liganden für *TLR2* im Verlauf von MI/R in das Blut abgegeben werden und so zu einer systemischen Aktivierung von *TLR2* führen. Die oben erwähnte Regulation der Proteinexpression von *TLR2* auch im nicht ischämischen Myokard nach 2-stündiger Reperfusion legt dies nahe. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war

daher, mit Hilfe der Stimulation eines Zellkultursystems das Plasma operierter Tiere auf potentiell enthaltene TLR-Liganden nach MI/R zu überprüfen. Hierzu sollten verschiedene Zellkultursysteme verwendet werden. Zur Etablierung wurden die verschiedenen Zelllinien zunächst mit bekannten Liganden stimuliert.

Nachdem Schäfer et al. Biglykan als Ligand für TLR2 und TLR4 beschrieben haben, wurden zunächst die verschiedenen Zelllinien mit Biglykan stimuliert und auf die Aktivierung von NFκB bzw. die nachfolgende Zytokinexpression analysiert [35]. Weiterhin wurden die Zellen mit dem TLR2-Liganden Pam₃Cys stimuliert.

Hierzu wurden zunächst HEK293 Zellen verwendet, welche normalerweise kein TLR2 exprimieren. Diese sind als Zellsystem erhältlich, bei dem HEK293 Zellen mit humanem oder murinem TLR2 sowie einem NFκB-gekoppelten SEAP-Reporter transfiziert sind, so dass hier die Aktivierung von NFκB infolge TLR2-Stimulation anhand der sezernierten SEAP-Menge nachweisbar ist. Bei den hier gezeigten Untersuchungen an HEK Blue™ hTLR2- und mTLR2 Zellen ließen sich bei Stimulation mit Pam₃Cys deutlich erhöhte SEAP-Spiegel im Zellüberstand nachweisen. Bei der Stimulation mit Biglykan war erst bei Anwendung einer Dosis von 100 µg/ml Biglykan eine erhöhte Sekretion von SEAP zu detektieren. Diese Konzentration ist vor dem Hintergrund, dass Moreth et al. zeigen konnten, dass zirkulierende Konzentrationen von ca. 1,2 µg/ml im Patienten durch die Aktivierung von TLR2/4 den Krankheitsverlauf bei systemischem Lupus erythematodes beeinflussen, als unphysiologisch zu erachten [109]. Auch bei THP1X Blue Zellen, die wie die HEK293 Zellen mit dem NFκB-gekoppelten SEAP-Reporter transfiziert sind, und bei RAW264.7 Makrophagen ließ sich nach Stimulation mit Pam₃Cys eine Aktivierung von TLR2 bzw. von NFκB nachweisen. Die Stimulation mit Biglykan induzierte jedoch in keiner der getesteten Zelllinien eine Aktivierung von NFκB oder der Zytokinexpression. Somit konnte weder eine Stimulation von TLR2 in den HEK Blue™ Zellen noch eine Stimulation von TLR2 oder TLR4 in den THP1X Blue™ Zellen oder RAW264.7 Makrophagen nachgewiesen werden, so dass das verwendete Biglykan hier als Ligand ausgeschlossen werden musste.

Schäfer et al. zeigten bei einer Biglykankonzentration von 10 µg/ml eine deutliche Stimulation von TLR2 und TLR4 in HEK Zellen. Weiterhin zeigten sie in Makrophagen von WT-Tieren eine deutliche Aktivierung von TNFα nach Stimulation mit Biglykan. Bei der Stimulation von Makrophagen von TLR2-defizienten Mäusen war diese Aktivierung signifikant geringer, wobei diese Reduktion in Makrophagen von TLR4-defizienten und

TLR2/4-doppelt-defizienten Mäusen noch deutlicher ausgeprägt war [35]. Die gleiche Gruppe konnte auch in einer weiteren Arbeit die Rolle von Biglykan als Ligand für TLR2 zeigen. Hier wiesen sie nach der Stimulation von dendritischen Zellen aus WT und TLR2- und TLR4-defizienten sowie TLR2/4-doppelt-defizienten Mäusen mit Biglykan eine deutliche Aktivierung von CXCL13 in WT-Makrophagen nach, die in TLR2- und TLR4-defizienten Zellen reduziert und in doppelt-defizienten Zellen nahezu aufgehoben war [109]. Schäfer et al. verwendeten für die Stimulation „intaktes“ Biglykan. Dieses wurde aus dem Medium von Biglykan-überexprimierenden HEK293 Zellen, die mit humaner Biglykan-cDNA stabil transfiziert wurden, isoliert und mittels Präzipitations- und Chromatographietechniken aufgereinigt [130, 131]. Bei den hier gezeigten Ergebnissen wurde für die Stimulation kommerziell erhältliches Biglykan verwendet, welches aus bovinem Knorpel isoliert wurde. Vor dem Hintergrund, dass die Gruppe in zwei unabhängigen Studien die Wirksamkeit des von ihnen nativ aus dem Zellüberstand isolierten Biglykan als TLR2-Ligand zeigen konnten, lassen sich die vorliegenden Ergebnisse wohl nur so erklären, dass das bei der Isolation von kommerziell erhältlichem Biglykan die für die Bindung an TLR2 wichtigen strukturellen Elemente verloren gehen.

Im Anschluss an die Etablierung wurden zunächst HEK Blue™ hTLR2 Zellen mit dem Plasma MI/R-operierter Tiere stimuliert.

Nach der Stimulation mit dem Plasma war im Überstand der HEK Blue™ hTLR2 Zellen keine Induktion der SEAP-Sekretion im Gegensatz zu Pam₃Cys-stimulierten Zellen nachweisen. Die Möglichkeit, dass die fehlende Induktion auf den Speziesunterschied zwischen dem Plasma operierter Mäuse und dem humanen TLR2 auf den HEK-Zellen zurückzuführen war, konnte nach Stimulation von HEK Blue™ mTLR2 Zellen, die mit murinem TLR2 transfiziert sind, ausgeschlossen werden, da auch hier eine Aktivierung der SEAP-Sekretion ausblieb. Eine zu geringe Menge des zur Stimulation eingesetzten Plasmas als Ursache für die ausbleibende NFκB-Aktivierung konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da auch bei Einsatz von 50% Plasma keine Induktion der SEAP-Sekretion nachgewiesen werden konnte.

Auch eine zu geringe Sensitivität des SEAP-Reporter-Systems als Ursache für die nicht nachweisbare NFκB-Aktivierung nach Stimulation konnte ausgeschlossen werden, nachdem die Proteinexpression und Phosphorylierung von IκBα, die der Aktivierung von NFκB die Phosphorylierung und ein Abbau von IκBα vorausgeht, sowie die Zytokinantwort nach Stimulation untersucht wurde [30]. Während nach Stimulation mit Pam₃Cys sowohl eine

Phosphorylierung als auch ein Abbau von I κ B α nachweisbar waren, die auf eine Aktivierung von NF κ B schließen lassen, waren nach Stimulation mit dem Plasma operierter Tiere weder eine Phosphorylierung noch Änderungen in der Proteinexpression von I κ B α zu detektieren. Gleiches galt für die Zytokinexpression nach Stimulation mit Plasma, die im Vergleich zur Kontrolle unverändert war. Damit konnte bei den HEK Blue™ hTLR2 Zellen eine Aktivierung von TLR2 durch potentielle Liganden im Plasma ausgeschlossen werden.

Studien, die sich mit der Untersuchung von endogenen TLR-Liganden befassten, nutzten oft die Stimulation von Monozyten um Liganden zu identifizieren [34, 35, 109, 132]. Daher wurde das Plasma der operierten Tiere neben den HEK Blue™ hTLR2 Zellen noch mithilfe von zwei monozytären Zellsystemen untersucht. Diese Zellen exprimieren neben TLR2 auch TLR4. Da auch bei TLR4-Defizienz ein Vorteil nach MI/R beschrieben ist, konnte so auch die Funktionalität des Systems, das Plasma operierter Tiere mithilfe der Stimulation von Zellen auf das Vorhandensein von TLR-Liganden nach MI/R zu untersuchen, sowohl für TLR2 als auch für TLR4 überprüft werden.

Zunächst wurden THP1X Blue™ Zellen mit dem Plasma stimuliert. Nach Stimulation mit Pam₃Cys war ein deutlicher SEAP-Anstieg nachweisbar. Die Stimulation mit Plasma führte zu keiner NF κ B-Aktivierung mit nachfolgender SEAP-Sekretion.

Auch hier konnte nach Stimulation von murinen RAW264.7 Makrophagen davon ausgegangen werden, dass die fehlende Aktivierung von NF κ B nicht auf den Speziesunterschied zwischen Plasma und Rezeptor in humanen THP1X Blue™ Zellen zurückzuführen war. Bei den RAW264.7 Makrophagen wurde wie bei den HEK293 Zellen, die Proteinexpression und Phosphorylierung von I κ B α untersucht. Nach Pam₃Cys-Stimulation ließ sich eine Verringerung der Proteinexpression von I κ B α nachweisen, die auf eine Degradation des Proteins und damit auf eine Aktivierung von NF κ B hinweist. Nach Stimulation mit Plasma ließ sich weder eine Veränderung in der Proteinexpression noch im Gehalt an phosphorylierten Protein nachweisen. Somit war auch bei den monozytären Zellsystemen keine Aktivierung von TLR2 oder TLR4 nach Stimulation mit Plasma von operierten Tieren zu detektieren.

Da bei drei verschiedenen Zellkultursystemen mit dem Plasma operierter Tiere keine Aktivierung von TLR2 erreicht werden konnte, lässt die Möglichkeit, die fehlende Aktivierung auf ein falsch gewähltes Zellkultursystem zurückzuführen relativ unwahrscheinlich erscheinen. Sie lässt sich jedoch nicht gänzlich ausschließen.

Aus den Ergebnissen der Plasmastimulation, bei denen nach der Stimulation keine Aktivierung von TLR2 nachgewiesen werden konnte, lassen sich verschiedene Schlüsse ziehen. Zunächst deutet die fehlende Aktivierung nach der Stimulation darauf hin, dass während MI/R TLR2-Liganden nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen in das Blut abgegeben werden. Dies würde bedeuten, dass es sich bei der Aktivierung von TLR2 nach MI/R um einen auf das Herz beschränkten Prozess handelt und dass es nach MI/R nicht zur systemischen Freisetzung von endogenen TLR2-Liganden kommt, wie es bei anderen inflammatorischen Prozessen, wie z.B. Diabetes Typ 1 für Liganden wie Hsp60 und HMGB1 oder bei systemischem Lupus erythematoses für den Liganden Biglykan beschrieben wurde [109, 133]. Dem gegenüber steht jedoch die Nachweisbarkeit der Regulation von TLR2 in der ANR.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Konzentration möglicher Liganden im Blut nicht ausreicht um im Zellkultursystem eine Aktivierung auszulösen. Dies erscheint jedoch vor dem Hintergrund, dass es auch nach Einsatz von 50% Plasma zu keiner messbaren Aktivierung kam, relativ unwahrscheinlich.

Nicht endgültig ausschließen lässt sich die Möglichkeit, dass es nach Stimulation nicht zu einer Aktivierung von TLR2 kam, weil TLR2 durch unspezifische Bindungen von Plasmabestandteilen blockiert wurde. Für diese Erklärung spricht, dass die SEAP-Sekretion, die nach Plasmastimulation beobachtet wurde, immer etwas geringer war als die basale SEAP-Sekretion, welche in der unstimulierten Kontrolle gemessen wurde.

Die Ergebnisse der Plasmastimulation sprechen dafür, dass die Aktivierung von TLR2 im Verlauf von MI/R wohl überwiegend über stationäre Liganden im Herzen erfolgt. Die systemische Freisetzung von Liganden lässt sich jedoch vor dem Hintergrund, dass wir zeigen konnten, dass TLR2 nach zwei Stunden Reperfusion nicht nur in der AR sondern auch in der ANR reguliert war, nicht endgültig ausschließen. Auch die protektiven Effekte der in der Literatur vielfach beschriebenen heterotropen Präkonditionierung weisen auf eine systemische Freisetzung von endogenen Liganden hin. Bei dieser Art der Präkonditionierung wird z.B. durch kurze Ischämie von Skelettmuskelgewebe oder mittels kurzer Okklusion der *Arteria mesenterica anterior* oder linken *Arteria renalis* vor der myokardialen Ischämie eine Reduktion der Infarktgröße erreicht [134, 135]. Da auch durch die Behandlung mit TLR2-Liganden wie Pam₃Cys oder Lipoteichonsäure eine Präkonditionierung über die Aktivierung von TLR2 beschrieben wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die Effekte der heterotropen

Präkonditionierung durch die Freisetzung von endogenen Liganden nach der Ischämie aus dem nicht-kardialen Gewebe vermittelt wird [123, 124].

In dieser Arbeit konnte über PI3K/Akt ein zusätzlicher Signalweg gezeigt werden, der an der Vermittlung der protektiven Effekte bei TLR2-Defizienz nach MI/R beteiligt ist. Die Frage nach dem Liganden, über den TLR2 bei MI/R aktiviert wird, bleibt ungeklärt. Das Matrixmolekül Biglykan konnte als prominentester Ligand bei MI/R ausgeschlossen werden, so dass wir vermuten, dass nicht ein Ligand allein, sondern verschiedene Liganden gleichzeitig freigesetzt werden, welche TLR2 aktivieren und so die myokardiale Schädigung verstärken.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Bis heute ist es trotz vieler Ansätze nicht gelungen, das Reperfusionssyndrom im klinischen Alltag in zufriedenstellendem Maße zu reduzieren. Vor diesem Hintergrund bieten die in dieser Arbeit und anderen Studien gezeigten protektiven Effekte der TLR2-Defizienz, die sich auch bei Anwendung eines TLR2-Antikörpers nachweisen ließen, einen neuen vielversprechenden Ansatz, den Schaden nach myokardialer Ischämie/Reperfusion zu reduzieren [86, 117]. Um diese protektiven Effekte im *knockout* für den klinischen Alltag nutzen zu können, war es Ziel dieser Arbeit den zugrundeliegenden Mechanismus im TLR2-*knockout* zu analysieren. Weiterhin sollte untersucht werden, wodurch TLR2 im Verlauf von MI/R aktiviert wird.

Die Daten der Studie an den Akt-Inhibitor-behandelten Tieren zeigen, dass die Protektion im TLR2-*knockout* durch die vermehrte Proteinexpression von Akt1 vermittelt wird. Da bezüglich der mRNA-Expression keine Unterschiede zwischen WT- und TLR2^{-/-}-Tieren nachweisbar waren und so eine vermehrte *de novo*-Synthese von Akt1 im TLR2-*knockout* wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann, ist von einer veränderten translationalen oder posttranslationalen Regulation in diesen Tieren auszugehen. Eine solche Regulation könnte zum Beispiel einen verringerten Abbau von Akt1 im *knockout* bedeuten. In Verbindung mit der Regulation von Akt sind unter anderem Ubiquitin-abhängige und Caspase-vermittelte Abbauprozesse beschrieben [136]. In weiteren Studien sollte geklärt werden, ob zwischen *knockout*- und WT-Tieren Unterschiede in der Aktivität der Abbauprozesse bestehen.

Die in dieser Arbeit gezeigte Reduktion der Infarktgröße im TLR2-defizienten Tier zeigt, dass die Aktivierung von TLR2 das Ausmaß des myokardialen Schadens nach MI/R beeinflusst. Geht man aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit nun davon aus, dass die systemische Aktivierung von TLR2 durch endogene Liganden über das Blut keine Rolle spielt, scheint es sich bei der Vermittlung des Ischämie/Reperfusionsschadens über TLR2-Aktivierung um einen Inflamationsprozess zu handeln, der lokal auf das Myokard beschränkt ist. Um dies näher zu analysieren, könnte das Proteinlysate der AR und der ANR zur Stimulation der in dieser Arbeit untersuchten Zellen verwendet werden. Sollte dabei eine Aktivierung von TLR2 nachgewiesen werden, könnte das ein Hinweis auf eine gezielte Freisetzung/Bildung von diversen TLR2-spezifischen endogenen Liganden im Myokard nach MI/R sein. Die

anschließende Identifizierung und Analyse der Expression dieser endogenen Liganden wäre von großem Nutzen, um die myokardiale Schädigung nach MI/R zu reduzieren.

Bei Biglykan-defizienten Tieren konnte keine Protektion nach MI/R im Vergleich zu Wildtyptieren nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es sich bei Biglykan wahrscheinlich nicht um den wichtigsten Liganden von TLR2 während MI/R handelt. Daher sollten in nachfolgenden Studien auch noch andere in der Literatur beschriebene Liganden, wie zum Beispiel HMGB1 oder Versican auf ihre Rolle bei MI/R untersucht werden [132, 137]. Um die Rolle von Biglykan endgültig zu klären, sollte die myokardiale Schädigung nach MI/R bei Biglykan-überexprimierenden WT- und TLR2-*knockout* Tieren untersucht werden, wie sie in der Studie von Moreth et al. beschrieben wurden [109]. Sollte bei den Biglykan-überexprimierenden WT-Tieren eine gesteigerte myokardiale Schädigung gegenüber Biglykan-überexprimierenden TLR2^{-/-}-Tieren nachgewiesen werden, würde dies zumindest die Beteiligung von Biglykan an der Aktivierung von TLR2 in unserem Modell belegen.

Insgesamt ist die Beeinflussung des TLR2-Signalwegs weiter ein interessantes therapeutisches Konzept, da die bisher von uns und anderen erhobenen präklinischen Daten eine Protektion durch TLR2-Deletion oder -Blockade zeigen, die über eine schiere Reduktion des Myokardschadens hinausgeht, sondern auch die akute Letalität im MI/R-Modell durch Reduktion der Inzidenz von Arrhythmien senkt. Vor dem Hintergrund einer hohen Prävalenz von heterozygoten Trägern eines dysfunktionellen TLR2-Polymorphismus könnte das genaue Verständnis der Rolle von TLR2 während MI/R und anderen inflammatorischen Situationen (z.B. Sepsis) helfen, individuelle Therapiekonzepte für diese Patientengruppe zu entwickeln [138].

6. Zusammenfassung

Der Myokardinfarkt ist immer noch eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland. Als Therapie der Wahl gilt die möglichst zeitnahe Reperfusion des ischämischen Gebiets. Bei der Reperfusion tritt das sogenannte „Reperfusionssyndrom“ auf. Dabei kommt es im Verlauf der Wiederdurchblutung des ischämischen Gebietes zu einer weiteren Schädigung des Gewebes. Das „Reperfusionssyndrom“ ist unter anderem durch eine massive Inflammation charakterisiert.

Bis heute wurden verschiedene Ansätze gewählt, um die myokardiale Schädigung nach Ischämie/Reperfusion zu reduzieren. Bislang konnte jedoch keiner dieser Ansätze im klinischen Alltag zufriedenstellende Ergebnisse liefern. Ein neuer, vielversprechender Ansatz ist die Modulation von Toll-like Rezeptor 2 (TLR2), einem Rezeptor des angeborenen Immunsystems. Wir und andere konnten zeigen, dass die genetische Defizienz von TLR2 und die Inhibition von TLR2 bei Myokardinfarkt und Reperfusion unter anderem zu einer Reduktion des myokardialen Schadens führen.

Toll-like Rezeptoren sind sogenannte *pattern recognition receptors*, welche mikrobielle Strukturen erkennen. Neben diesen exogenen Liganden erkennen TLRs auch endogene Liganden, die im Verlauf pathophysiologischer Prozesse freigesetzt werden. Nach Bindung eines Liganden an TLR2 wird eine Signalkaskade aktiviert, welche zu der Aktivierung überwiegend proinflammatorischer Mediatoren führt. Da bislang nicht bekannt ist, welche endogenen Liganden im Verlauf von Myokardinfarkt und Reperfusion (MI/R) an TLR2 binden, war es Ziel dieser Arbeit, die Rolle eines potentiellen Liganden, dem extrazellulären-Matrix-Molekül Biglykan, zu untersuchen. Biglykan gehört zur Familie der *small leucin rich proteoglycans* und spielt insbesondere in der Ausbildung der fibrillären Struktur von Kollagen eine wichtige Rolle. Weiterhin wird Biglykan in der Literatur als Ligand für TLR2 in Makrophagen beschrieben. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass ein genetischer *knockout* von Biglykan keine protektiven Effekte nach Myokardinfarkt und 24 Stunden Reperfusion hat und so zumindest als prominentester Ligand nach MI/R ausgeschlossen werden kann. Auffällig war jedoch, dass nach 2-stündiger Reperfusion die TLR2-Proteinexpression bei den Biglykan-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp sowohl im Ischämiegebiet als auch in dem Gebiet, das keiner Ischämie ausgesetzt war, signifikant reduziert war. Nach 24-stündiger Reperfusion war dieser Effekt nicht mehr zu detektieren.

Bislang konnte nicht geklärt werden, ob die Aktivierung von TLR2 bei MI/R auf infolge der myokardialen Schädigung systemisch zirkulierende Liganden zurückzuführen ist, oder ob die Aktivierung nur durch stationäre Liganden unmittelbar im Herzen erfolgt. Daher sollte in dieser Arbeit das Plasma von Mäusen nach MI/R mit Hilfe der Stimulation verschiedener Zellkultursysteme auf möglicherweise nach MI/R freigesetzte Liganden untersucht werden. Die hier gezeigten Daten sprechen gegen eine systemische Freisetzung von endogenen Liganden, da in keinem der drei getesteten Zellkultursysteme eine Aktivierung von TLR2 nach Stimulation mit Plasma nachweisbar war.

Die Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalwegs spielt eine Rolle in der Aktivierung von Zellwachstum, -differenzierung und -proliferation. Die Literatur gibt Hinweise auf eine Verbindung zwischen der Aktivierung TLR2 und dem PI3K/Akt-Signalweg. Daher sollte hier neben der Frage, wodurch TLR2 bei MI/R aktiviert wird, auch die Bedeutung dieses Signalwegs für die Effekte im TLR2-*knockout* untersucht werden. Wir konnten zeigen, dass die TLR2-defizienten Tiere im Vergleich mit den WT-Tieren eine signifikant höhere Proteinexpression der Serin-Threonin-Kinase Akt1 aufwiesen. Weiterhin konnten wir nach pharmakologischer Inhibition von Akt zeigen, dass die protektiven Effekte im *knockout* durch Akt vermittelt werden.

TLR2-defiziente Tiere weisen neben einer reduzierten myokardialen Schädigung auch eine deutlich geringere Letalität durch eine reduzierte Inzidenz von Arrhythmien auf. Nicht zuletzt von diesem Hintergrund bietet die Modifikation des TLR2-Signalwegs ein vielversprechendes therapeutisches Konzept. Die hier gezeigten Daten können helfen die der Protektion zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen.

7. Summary

Myocardial ischemia is still one of the leading causes of death in Germany. The therapy of choice is the timely restoration of the myocardial blood flow. In the cause of reperfusion the so called “reperfusion injury” leads to further damage in the ischemic area. This damage is, among others, caused by a massive inflammation.

To this date many approaches have been described to modify the reperfusion injury following myocardial ischemia and reperfusion (MI/R) but so far none of them was successfully translated into clinical practice. A new, very promising approach is the modulation of Toll-like receptor 2 (TLR2). Recently we and others have shown that the genetic knockout of TLR2 or pharmacological inhibition of TLR2 with an antibody results in a reduction of myocardial damage after MI/R. TLRs are receptors of the innate immunity belonging to the family of pattern recognition receptors that recognize microbial components. Upon activation of TLR2 a signal transduction cascade is initiated that causes the release of proinflammatory mediators. Besides exogenous ligands like bacterial wall components, TLRs also recognize endogenous ligands that are released due to pathophysiological processes.

Endogenous ligands responsible for activation of TLR2 during MI/R are not identified so far and the underlying mechanisms of protective effects due to TLR2 deficiency are not completely elucidated. Thus, we aimed to elucidate 1) potential ligands responsible for TLR2 activation and 2) the role of the phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/Akt pathway for the cardioprotection in TLR2-deficient mice.

Since Biglycan is well described as an endogenous TLR2 ligand, we investigated its role during MI/R. Using Biglycan-knockout mice revealed that it had no cardio-protective effects after 30 minutes of myocardial ischemia and 24 hours of reperfusion. Therefore the small leucin rich proteoglycan could be excluded at least as the most prominent ligand for TLR2 during MI/R.

So far it remains unclear whether MI/R results in a systemic activation of TLR2 due to circulating ligands after myocardial damage or if the activation of TLR2 remains limited to the injured area of the heart. Hence we intended to test the plasma of mice for the systemic release of endogenous TLR2-ligands in the course of MI/R by the stimulation of different cell-systems. Since we could not observe any TLR2-activation upon stimulation with plasma of

operated animals in any of the tested systems the data shown here provide evidence that no endogenous TLR2 ligands are systemically released due to myocardial injury during MI/R.

The signal transduction via PI3K/Akt plays a role in the regulation of cell survival and – proliferation. Recent studies indicate a link between the activation of TLR2 and the signal transduction pathway via PI3K/Akt. Therefore we aimed to investigate the relevance of this pathway for the protective effects in TLR2-knockout mice after MI/R.

We were able to show an increased Akt1-protein expression in TLR2-knockout animals compared to wildtype animals. Additionally we demonstrated that the protective effects in knockout mice are mediated by Akt.

Besides the reduced myocardial damage, TLR2-deficient mice reveal a reduction in the incidence of lethal arrhythmias. These findings point out that modification of the TLR2-pathway provides good potential for a promising therapeutic concept. The data presented can help to understand the underlying mechanisms.

8. Literaturverzeichnis

1. Hamm, C.W., [Guidelines: Acute coronary syndrome (ACS). II: Acute coronary syndrome with ST-elevation]. *Z Kardiol*, 2004. 93(4): p. 324-41.
2. Hamm, C.W., [Guidelines: acute coronary syndrome (ACS). 1: ACS without persistent ST segment elevations]. *Z Kardiol*, 2004. 93(1): p. 72-90.
3. Van de Werf, F., et al., *Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology*. *Eur Heart J*, 2008. 29(23): p. 2909-45.
4. Fuster, V., et al., *Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 46(6): p. 937-54.
5. Verdouw, P.D., et al., *Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes*. *Cardiovasc Res*, 1998. 39(1): p. 121-35.
6. Reimer, K.A., et al., *The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs*. *Circulation*, 1977. 56(5): p. 786-94.
7. Bulkely, B.H. and G.M. Hutchins, *Myocardial consequences of coronary artery bypass graft surgery. The paradox of necrosis in areas of revascularization*. *Circulation*, 1977. 56(6): p. 906-13.
8. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *Myocardial reperfusion: a double-edged sword?* *J Clin Invest*, 1985. 76(5): p. 1713-9.
9. Kloner, R.A., C.E. Ganote, and R.B. Jennings, *The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog*. *J Clin Invest*, 1974. 54(6): p. 1496-508.
10. Moens, A.L., et al., *Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process*. *Int J Cardiol*, 2005. 100(2): p. 179-90.
11. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. *N Engl J Med*, 2007. 357(11): p. 1121-35.
12. Akgur, F.M., et al., *Role of superoxide in hemorrhagic shock-induced P-selectin expression*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. 279(2): p. H791-7.
13. Gaboury, J.P., D.C. Anderson, and P. Kubes, *Molecular mechanisms involved in superoxide-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo*. *Am J Physiol*, 1994. 266(2 Pt 2): p. H637-42.
14. Patel, K.D., et al., *Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils*. *J Cell Biol*, 1991. 112(4): p. 749-59.
15. Vinten-Johansen, J., *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 2004. 61(3): p. 481-97.
16. McManus, L.M., et al., *Complement localization in ischemic baboon myocardium*. *Lab Invest*, 1983. 48(4): p. 436-47.
17. Jordan, J.E., Z.Q. Zhao, and J. Vinten-Johansen, *The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 1999. 43(4): p. 860-78.
18. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 1998. 38(2): p. 291-300.
19. Bolli, R., et al., *Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy*. *Circ Res*, 2004. 95(2): p. 125-34.
20. Turvey, S.E. and D.H. Broide, *Innate immunity*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. 125(2 Suppl 2): p. S24-32.

21. Janeway, C.A., Jr., *The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self*. Immunol Today, 1992. 13(1): p. 11-6.
22. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. Cell, 1997. 91(3): p. 295-8.
23. Anderson, K.V., L. Bokla, and C. Nusslein-Volhard, *Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product*. Cell, 1985. 42(3): p. 791-8.
24. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. 86(6): p. 973-83.
25. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, 1997. 388(6640): p. 394-7.
26. Albiger, B., et al., *Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors*. J Intern Med, 2007. 261(6): p. 511-28.
27. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 335-76.
28. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death Differ, 2006. 13(5): p. 816-25.
29. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. 124(4): p. 783-801.
30. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(7): p. 499-511.
31. Watters, T.M., E.F. Kenny, and L.A. O'Neill, *Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins*. Immunol Cell Biol, 2007. 85(6): p. 411-9.
32. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. Immunity, 2011. 34(5): p. 637-50.
33. Ohashi, K., et al., *Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex*. J Immunol, 2000. 164(2): p. 558-61.
34. Asea, A., et al., *Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4*. J Biol Chem, 2002. 277(17): p. 15028-34.
35. Schaefer, L., et al., *The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages*. J Clin Invest, 2005. 115(8): p. 2223-33.
36. Johnson, G.B., et al., *Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4*. J Immunol, 2002. 168(10): p. 5233-9.
37. Bianchi, M.E., *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger*. J Leukoc Biol, 2007. 81(1): p. 1-5.
38. Marshak-Rothstein, A., *Toll-like receptors in systemic autoimmune disease*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(11): p. 823-35.
39. Tsan, M.F. and B. Gao, *Endogenous ligands of Toll-like receptors*. J Leukoc Biol, 2004. 76(3): p. 514-9.
40. Yu, L., L. Wang, and S. Chen, *Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance*. J Cell Mol Med, 2010. 14(11): p. 2592-603.
41. O'Neill, L.A. and A.G. Bowie, *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2007. 7(5): p. 353-64.
42. De Plaen, I.G., et al., *Lipopolysaccharide induces CXCL2/macrophage inflammatory protein-2 gene expression in enterocytes via NF-kappaB activation: independence*

- from endogenous TNF-alpha and platelet-activating factor.* Immunology, 2006. 118(2): p. 153-63.
43. Ueda, A., et al., *NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene.* J Immunol, 1994. 153(5): p. 2052-63.
 44. Collart, M.A., P. Baeuerle, and P. Vassalli, *Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B.* Mol Cell Biol, 1990. 10(4): p. 1498-506.
 45. Ishikawa, Y., et al., *Establishment of lipopolysaccharide-dependent nuclear factor kappa B activation in a cell-free system.* J Biol Chem, 1995. 270(8): p. 4158-64.
 46. Shimizu, H., et al., *Involvement of a NF-kappa B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines.* Mol Cell Biol, 1990. 10(2): p. 561-8.
 47. Eferl, R. and E.F. Wagner, *AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis.* Nat Rev Cancer, 2003. 3(11): p. 859-68.
 48. Horng, T., G.M. Barton, and R. Medzhitov, *TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway.* Nat Immunol, 2001. 2(9): p. 835-41.
 49. Horng, T., et al., *The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors.* Nature, 2002. 420(6913): p. 329-33.
 50. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin.* Immunity, 1999. 11(1): p. 115-22.
 51. Kawai, T., et al., *Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes.* J Immunol, 2001. 167(10): p. 5887-94.
 52. Yamamoto, M., et al., *Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling.* J Immunol, 2002. 169(12): p. 6668-72.
 53. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway.* Science, 2003. 301(5633): p. 640-3.
 54. Oshiumi, H., et al., *TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta.* J Biol Chem, 2003. 278(50): p. 49751-62.
 55. Feng, Y. and W. Chao, *Toll-like receptors and myocardial inflammation.* Int J Inflam, 2011. 2011: p. 170352.
 56. Pilsbury, L.E., R.L. Allen, and M. Vordermeier, *Modulation of Toll-like receptor activity by leukocyte Ig-like receptors and their effects during bacterial infection.* Mediators Inflamm, 2010. 2010: p. 536478.
 57. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity.* Int Immunol, 2005. 17(1): p. 1-14.
 58. Aliprantis, A.O., et al., *Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2.* Science, 1999. 285(5428): p. 736-9.
 59. Jin, M.S., et al., *Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide.* Cell, 2007. 130(6): p. 1071-82.
 60. Arbibe, L., et al., *Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway.* Nat Immunol, 2000. 1(6): p. 533-40.
 61. Leever, S.J., B. Vanhaesebroeck, and M.D. Waterfield, *Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage.* Curr Opin Cell Biol, 1999. 11(2): p. 219-25.

-
62. Koyasu, S., *The role of PI3K in immune cells*. Nat Immunol, 2003. 4(4): p. 313-9.
 63. Cantley, L.C., *The phosphoinositide 3-kinase pathway*. Science, 2002. 296(5573): p. 1655-7.
 64. Kandel, E.S. and N. Hay, *The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB*. Exp Cell Res, 1999. 253(1): p. 210-29.
 65. Carnero, A., *The PKB/AKT pathway in cancer*. Curr Pharm Des, 2010. 16(1): p. 34-44.
 66. Santos-Sierra, S., et al., *Mal connects TLR2 to PI3Kinase activation and phagocyte polarization*. EMBO J, 2009. 28(14): p. 2018-27.
 67. Ojaniemi, M., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages*. Eur J Immunol, 2003. 33(3): p. 597-605.
 68. Rhee, S.H., et al., *Role of MyD88 in phosphatidylinositol 3-kinase activation by flagellin/toll-like receptor 5 engagement in colonic epithelial cells*. J Biol Chem, 2006. 281(27): p. 18560-8.
 69. Sarkar, S.N., et al., *Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling*. Nat Struct Mol Biol, 2004. 11(11): p. 1060-7.
 70. Hayden, M.S., A.P. West, and S. Ghosh, *NF-kappaB and the immune response*. Oncogene, 2006. 25(51): p. 6758-80.
 71. Leemans, J.C., et al., *Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney*. J Clin Invest, 2005. 115(10): p. 2894-903.
 72. Wu, H., et al., *TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury*. J Clin Invest, 2007. 117(10): p. 2847-59.
 73. Tsung, A., et al., *Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells*. J Immunol, 2005. 175(11): p. 7661-8.
 74. Li, C., et al., *Early activation of IKKbeta during in vivo myocardial ischemia*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. 280(3): p. H1264-71.
 75. Li, C., W. Browder, and R.L. Kao, *Early activation of transcription factor NF-kappaB during ischemia in perfused rat heart*. Am J Physiol, 1999. 276(2 Pt 2): p. H543-52.
 76. Morishita, R., et al., *In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction*. Nat Med, 1997. 3(8): p. 894-9.
 77. Boyd, J.H., et al., *Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response*. Cardiovasc Res, 2006. 72(3): p. 384-93.
 78. Frantz, S., et al., *Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium*. J Clin Invest, 1999. 104(3): p. 271-80.
 79. Chong, A.J., et al., *Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004. 128(2): p. 170-9.
 80. Oyama, J., et al., *Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice*. Circulation, 2004. 109(6): p. 784-9.
 81. Shishido, T., et al., *Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction*. Circulation, 2003. 108(23): p. 2905-10.
 82. Favre, J., et al., *Toll-like receptors 2-deficient mice are protected against postischemic coronary endothelial dysfunction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. 27(5): p. 1064-71.
 83. Mersmann, J., et al., *Toll-like receptor 2 signaling triggers fatal arrhythmias upon myocardial ischemia-reperfusion*. Crit Care Med, 2010. 38(10): p. 1927-32.
 84. Sakata, Y., et al., *Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 292(1): p. H503-9.

85. Metzler, B., et al., *Plasma cardiac troponin T closely correlates with infarct size in a mouse model of acute myocardial infarction*. Clin Chim Acta, 2002. 325(1-2): p. 87-90.
86. Arslan, F., et al., *Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody*. Circulation, 2010. 121(1): p. 80-90.
87. Fujio, Y., et al., *Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart*. Circulation, 2000. 101(6): p. 660-7.
88. Matsui, T., et al., *Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro*. Circulation, 1999. 100(23): p. 2373-9.
89. Hua, F., et al., *Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in TLR4-deficient mice is mediated through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism*. J Immunol, 2007. 178(11): p. 7317-24.
90. Ha, T., et al., *TLR2 ligands induce cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury through a PI3K/Akt-dependent mechanism*. Cardiovasc Res, 2010. 87(4): p. 694-703.
91. Iozzo, R.V., *The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins*. J Biol Chem, 1999. 274(27): p. 18843-6.
92. Schaefer, L. and R.V. Iozzo, *Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction*. J Biol Chem, 2008. 283(31): p. 21305-9.
93. Hocking, A.M., T. Shinomura, and D.J. McQuillan, *Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix*. Matrix Biol, 1998. 17(1): p. 1-19.
94. Fisher, L.W., et al., *Human biglycan gene. Putative promoter, intron-exon junctions, and chromosomal localization*. J Biol Chem, 1991. 266(22): p. 14371-7.
95. Douglas, T., et al., *Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan*. Biomacromolecules, 2006. 7(8): p. 2388-93.
96. Wiberg, C., et al., *Biglycan and decorin bind close to the n-terminal region of the collagen VI triple helix*. J Biol Chem, 2001. 276(22): p. 18947-52.
97. Xu, T., et al., *Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice*. Nat Genet, 1998. 20(1): p. 78-82.
98. Corsi, A., et al., *Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues*. J Bone Miner Res, 2002. 17(7): p. 1180-9.
99. Ruoslahti, E. and Y. Yamaguchi, *Proteoglycans as modulators of growth factor activities*. Cell, 1991. 64(5): p. 867-9.
100. Hildebrand, A., et al., *Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta*. Biochem J, 1994. 302 (Pt 2): p. 527-34.
101. Yamamoto, K., et al., *Increase in the expression of biglycan mRNA expression Co-localized closely with that of type I collagen mRNA in the infarct zone after experimentally-induced myocardial infarction in rats*. J Mol Cell Cardiol, 1998. 30(9): p. 1749-56.
102. Ahmed, M.S., et al., *Induction of myocardial biglycan in heart failure in rats--an extracellular matrix component targeted by AT(1) receptor antagonism*. Cardiovasc Res, 2003. 60(3): p. 557-68.

103. Westermann, D., et al., *Biglycan is required for adaptive remodeling after myocardial infarction*. Circulation, 2008. 117(10): p. 1269-76.
104. Csont, T., et al., *Biglycan protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury: role of nitric oxide*. J Mol Cell Cardiol, 2010. 48(4): p. 649-52.
105. He, Y.W., et al., *The extracellular matrix protein mindin is a pattern-recognition molecule for microbial pathogens*. Nat Immunol, 2004. 5(1): p. 88-97.
106. Okamura, Y., et al., *The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4*. J Biol Chem, 2001. 276(13): p. 10229-33.
107. Tufvesson, E. and G. Westergren-Thorsson, *Tumour necrosis factor-alpha interacts with biglycan and decorin*. FEBS Lett, 2002. 530(1-3): p. 124-8.
108. Tufvesson, E. and G. Westergren-Thorsson, *Alteration of proteoglycan synthesis in human lung fibroblasts induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha*. J Cell Biochem, 2000. 77(2): p. 298-309.
109. Moreth, K., et al., *The proteoglycan biglycan regulates expression of the B cell chemoattractant CXCL13 and aggravates murine lupus nephritis*. J Clin Invest, 2010. 120(12): p. 4251-72.
110. Mersmann, J., et al., *Rosiglitazone is cardioprotective in a murine model of myocardial I/R*. Shock, 2008. 30(1): p. 64-8.
111. Nava, P., et al., *Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways*. Immunity, 2010. 32(3): p. 392-402.
112. Wymann, M.P., et al., *Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction*. Mol Cell Biol, 1996. 16(4): p. 1722-33.
113. Yang, L., et al., *Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt*. Cancer Res, 2004. 64(13): p. 4394-9.
114. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-54.
115. Wang, X., et al., *PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update*. Nucleic Acids Res, 2012. 40(Database issue): p. D1144-9.
116. Turer, A.T. and J.A. Hill, *Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy*. Am J Cardiol, 2010. 106(3): p. 360-8.
117. Mersmann, J., et al., *Left ventricular dilation in toll-like receptor 2 deficient mice after myocardial ischemia/reperfusion through defective scar formation*. Basic Res Cardiol, 2011. 106(1): p. 89-98.
118. Cardenas, M.E., et al., *Signal-transduction cascades as targets for therapeutic intervention by natural products*. Trends Biotechnol, 1998. 16(10): p. 427-33.
119. Matsui, T., et al., *Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo*. Circulation, 2001. 104(3): p. 330-5.
120. Karst, A.M., et al., *Role of p53 up-regulated modulator of apoptosis and phosphorylated Akt in melanoma cell growth, apoptosis, and patient survival*. Cancer Res, 2006. 66(18): p. 9221-6.
121. Mersmann, J., et al., *Measure for measure-determination of infarct size in murine models of myocardial ischemia and reperfusion: a systematic review*. Shock, 2011. 35(5): p. 449-55.
122. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. 74(5): p. 1124-36.

-
123. Mersmann, J., et al., *Preconditioning by toll-like receptor 2 agonist Pam3CSK4 reduces CXCL1-dependent leukocyte recruitment in murine myocardial ischemia/reperfusion injury*. Crit Care Med, 2010. 38(3): p. 903-9.
 124. Zacharowski, K., et al., *Lipoteichoic acid induces delayed protection in the rat heart: A comparison with endotoxin*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. 20(6): p. 1521-8.
 125. Campbell, P.H., et al., *Effects of biglycan deficiency on myocardial infarct structure and mechanics*. Mol Cell Biomech, 2008. 5(1): p. 27-35.
 126. Beran, O., R. Potmesil, and M. Holub, *Differences in Toll-like receptor expression and cytokine production after stimulation with heat-killed Gram-positive and Gram-negative bacteria*. Folia Microbiol (Praha), 2011. 56(3): p. 283-7.
 127. Kurt-Jones, E.A., et al., *Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils*. Blood, 2002. 100(5): p. 1860-8.
 128. Pedregosa, J.F., et al., *TLR2 and TLR4 expression after kidney ischemia and reperfusion injury in mice treated with FTY720*. Int Immunopharmacol, 2011. 11(9): p. 1311-8.
 129. Redel, A., et al., *Impact of ischemia and reperfusion times on myocardial infarct size in mice in vivo*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. 233(1): p. 84-93.
 130. Kresse, H., et al., *Different usage of the glycosaminoglycan attachment sites of biglycan*. J Biol Chem, 2001. 276(16): p. 13411-6.
 131. Schaefer, L., et al., *Regulation of fibrillin-1 by biglycan and decorin is important for tissue preservation in the kidney during pressure-induced injury*. Am J Pathol, 2004. 165(2): p. 383-96.
 132. Yu, M., et al., *HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2*. Shock, 2006. 26(2): p. 174-9.
 133. Devaraj, S., et al., *Increased levels of ligands of Toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes*. Diabetologia, 2009. 52(8): p. 1665-8.
 134. Birnbaum, Y., S.L. Hale, and R.A. Kloner, *Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit*. Circulation, 1997. 96(5): p. 1641-6.
 135. Gho, B.C., et al., *Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue*. Circulation, 1996. 94(9): p. 2193-200.
 136. Liao, Y. and M.C. Hung, *Physiological regulation of Akt activity and stability*. Am J Transl Res, 2010. 2(1): p. 19-42.
 137. Kim, S., et al., *Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis*. Nature, 2009. 457(7225): p. 102-6.
 138. Merx, S., et al., *Characterization and investigation of single nucleotide polymorphisms and a novel TLR2 mutation in the human TLR2 gene*. Hum Mol Genet, 2007. 16(10): p. 1225-32.

9. Publikationen

Diese Dissertation wurde in Teilen in folgendem Artikel veröffentlicht:

Akt or Phosphoinositide-3-kinase inhibition reverses cardio-protection in Toll-like receptor 2 deficient mice.

Mersmann J, Tran N, **Latsch K**, Habeck K, Iskandar F, Zimmermann R, Zacharowski K. Resuscitation. 2012 Apr 11. [Epub ahead of print]

Posterpräsentationen:

Die Aktivität der Serin-Threonin Kinase Akt ist essentiell für die Verminderung des Myokardschadens nach myokardialer Ischämie und Reperfusion in Toll-like Rezeptor 2-defizienten Mäusen

Kathrina Latsch; Nguyen Tran; Katharina Habeck; Franziska Iskandar; René Zimmermann; Kai Zacharowski; Jan Mersmann, DAC, 2011

Die Hemmung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) vermindert die Infarktgrößenreduktion in Toll-like Rezeptor 2-defizienten Mäusen

Jan Mersmann, Nguyen Tran, Franziska Iskandar, **Kathrina Latsch**, Katharina Habeck, René Zimmermann, Kai Zacharowski, DAC, 2011

Weitere Publikationen:

Measure for measure-determination of infarct size in murine models of myocardial ischemia and reperfusion: a systematic review. Mersmann J, **Latsch K**, Habeck K, Zacharowski K. Shock. 2011 May;35(5):449-55. Review.

Left ventricular dilation in toll-like receptor 2 deficient mice after myocardial ischemia/reperfusion through defective scar formation. Mersmann J, Habeck K, **Latsch K**, Zimmermann R, Jacoby C, Fischer JW, Hartmann C, Schrader J, Kirschning CJ, Zacharowski K. Basic Res Cardiol. 2011 Jan;106(1):89-98. Epub 2010 Oct 22.

10. Projektförderung

Diese Projekt wurde im Rahmen des SFB815 „Redox-Regulation: Generatorsysteme und funktionelle Konsequenzen“ gefördert (Teilprojekt A17 Zacharowski).

11. Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die mich in den letzten beiden Jahren unterstützt haben.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Joachim Roth für die Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin bedanken.

Herr Prof. Dr. Dr. Kai Zacharowski danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Institut durchführen zu dürfen, sowie Dr. Jan Mersmann und Dr. René Zimmermann für die gute Betreuung der Arbeit.

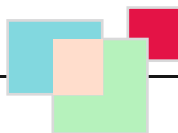
Vielen Dank auch an das gesamte Team des KAIS-Forschungslabor für die tolle Zusammenarbeit, die Hilfe im Labor und viele aufmunternde Gespräche, die nicht immer nur fachlicher Natur waren. Mein besonderer Dank geht hier an Vera für ihre Hilfe im Labor und Carla für die Korrektur der Arbeit.

Ein besonderer Dank auch meinen Freunden besonders Julia N. und Julia M., die mit ihrem Zuspruch halfen auch die schwierigen Phasen meiner Promotion zu überwinden.

Der größte Dank geht an meine Familie und an meinen Freund Florian für die vielen aufbauenden Worte, die uneingeschränkte Unterstützung und dafür, dass sie immer für mich da sind.

12. Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5938-5



9 783835 195938 5

Cover photo: © blueringmedia